

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS



CONTRIBUCION AL DIAGNOSTICO Y LA EPIDEMIOLOGIA
DE LAS INFECCIONES POR VIRUS EPSTEIN-BARR,
CITOMEGALOVIRUS Y VIRUS HERPES HUMANO-6

TESIS DOCTORAL

FERNANDO DE ORY MANCHON

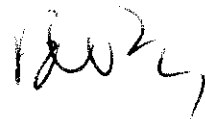
Madrid, 1994

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

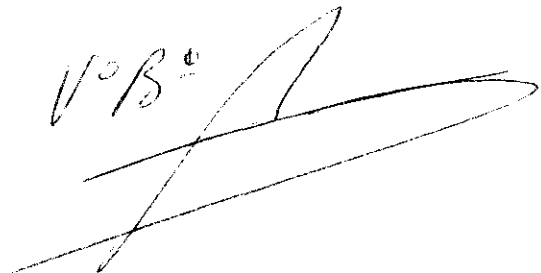
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

CONTRIBUCION AL DIAGNOSTICO Y LA EPIDEMIOLOGIA
DE LAS INFECCIONES POR VIRUS EPSTEIN-BARR,
CITOMEGALOVIRUS Y VIRUS HERPES HUMANO-6

Memoria presentada por el
Licenciado D. Fernando
DE ORY MANCHON para optar
al Grado de Doctor en
Ciencias Biológicas



Trabajo realizado bajo la
dirección del Dr. D.
Rafael NAJERA MORRONGO



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rafael Nájera Morrondo, a quien no sólo le debo la dirección de la tesis, sino también gran parte de mi formación como virólogo.

A Asia de la Loma, directora del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, por las facilidades que me ha prestado en las últimas fases de la tesis.

A mis compañeros de laboratorio, Teo, Ma Angeles, Jesús, Lala, Pilar, e Inma, por la comprensión que han mostrado este tiempo de atrás, y por los cafés.

A Pilar Pérez-Breña, Carlos Domingo y Julio Vázquez por su amistad y apoyo.

A José M. Echevarría, María V. Fernández, José Antonaya, Angel del Pozo, que han colaborado en diversos aspectos de este trabajo.

A la profesora Josefina Rodríguez de Lecea, ponente de la tesis, por las facilidades que me ha dado en mi relación con la Universidad.

A Petri, Elva y Ana Rosa por toda su tolerancia y comprensión.

A Petri

A Elva y a Ana Rosa

| | |
|---|-----------|
| I. INTRODUCCION | 1 |
| I.1. LOS VIRUS. CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES Y BIOLOGICAS | 2 |
| I.1.1. CLASIFICACION Y NOMENCLATURA | 2 |
| I.1.2. ESTRUCTURA | 5 |
| I.1.3. ESTRUCTURA DEL GENOMA | 7 |
| I.1.4. CARACTERISTICAS BIOLOGICAS DEL VEB | 8 |
| I.1.4.1. CICLO BIOLOGICO DEL VEB | 9 |
| I.1.4.2. ESTRUCTURA ANTIGENICA DEL VEB | 10 |
| I.2. LA MONONUCLEOSIS INFECCIOSA | 13 |
| I.2.1. PATOGENIA DE LA MONONUCLEOSIS INFECCIOSA | 14 |
| I.2.3. MANIFESTACIONES CLINICAS | 17 |
| I.2.4. COMPLICACIONES DE LA MONONUCLEOSIS INFECCIOSA | 20 |
| I.2.5. DATOS DE LABORATORIO | 23 |
| I.2.5.1. ALTERACIONES HEMATOLOGICAS | 23 |
| I.2.5.2. OTRAS ALTERACIONES | 24 |
| I.2.6. RESPUESTA INMUNE | 25 |
| I.3. METODOS PARA EL DIAGNOSTICO VIROLOGICO DE LAS INFECCIONES POR VEB, CMV Y VHH-6 | 27 |
| I.3.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LOS VIRUS | 27 |
| I.3.2. SEROLOGIA | 28 |
| I.3.2.1. METODOS SEROLOGICOS DE APLICACION AL VEB | 29 |
| I.3.2.1.1. ANTICUERPOS HETEROFILOS | 29 |
| I.3.2.1.2. RESPUESTA SEROLOGICA ESPECIFICA | 30 |
| I.3.2.2. METODOS SEROLOGICOS DE APLICACION AL CMV | 34 |
| I.3.2.3. METODOS SEROLOGICOS DE APLICACION AL VHH-6 | 35 |
| II. OBJETIVOS | 37 |
| III. MATERIALES Y METODOS | 42 |
| III.1. MUESTRAS | 43 |
| III.1.1. Seroprevalencia frente a VEB, CMV y VHH-6 | 43 |
| III.1.2. Anticuerpos IgG frente a VEB, CMV y VHH-6 en los dos primeros años de la vida | 43 |
| III.1.3. Implicación de VEB, CMV y VHH-6 en síndromes mononucleósicos infantiles | 44 |
| III.1.4. Valoración de criterios serológicos de infección por VEB | 45 |
| III.1.5. Marcadores serológicos de infección por VEB en niños positivos al VIH, en relación con la presencia de neumonía intersticial linfoide | 47 |
| III.2. METODOS SEROLOGICOS | 48 |
| III.2.1. Métodos serológicos específicos para anticuerpos frente a VEB | 48 |

| | |
|---|----|
| III.2.1.1. Determinación de anticuerpos IgG anti-VCA | 48 |
| III.2.1.2. Determinación de IgM anti-VCA | 50 |
| III.2.1.3. Determinación de anticuerpos anti-EBNA | 51 |
| III.2.1.4. Determinación de IgG anti-EA | 52 |
| III.2.1.5. Caracterización de la avidéz de IgG anti-VCA | 53 |
| III.2.1.6. Determinaciones de IgG e IgM frente al péptido sintético p62 | 56 |
| III.2.1.7. Determinaciones de IgG e IgM frente a las proteínas recombinantes p/54 y p/138 del antígeno temprano, y de IgG frente a la proteína recombinante p/72 del antígeno nuclear | 57 |
| III.2.2. Determinaciones de anticuerpos heterófilos | 59 |
| III.2.2.1. Aglutinación de eritrocitos después de adsorción diferencial con estroma de eritrocitos bovinos y extracto de riñón de cobayo | 59 |
| III.2.2.2. Aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con glicoproteínas de la membrana de eritrocitos bovinos | 59 |
| III.2.3. Determinaciones de anticuerpos frente a CMV | 60 |
| III.2.3.1. Determinación de IgM anti-CMV | 60 |
| III.2.3.1.1. Determinación de IgM anti-CMV por ELISA de captura anti- μ utilizando antígeno marcado | 60 |
| III.2.3.1.2. Determinación de IgM anti-CMV por ELISA indirecto | 61 |
| III.2.3.2. Determinación de IgG anti-CMV | 62 |
| III.2.3.3. Caracterización de la avidéz de IgG anti-CMV | 66 |
| III.2.4. Determinaciones de IgM anti-rubéola | 67 |
| III.2.5. Determinaciones de anticuerpos frente a VHH-6 | 67 |
| III.2.5.1. Producción de antígeno | 67 |
| III.2.5.2. Determinación de IgG frente a VHH-6 | 68 |
| III.2.5.3. Determinación de IgM frente a VHH-6 | 69 |
| III.2.5.4. Caracterización de la avidéz de IgG anti-VHH-6 | 71 |
| III.3. Análisis estadístico | 71 |
| IV. RESULTADOS | 72 |

| | |
|--|-----|
| IV.1. SEROPREVALENCIA FRENTE A VEB, CMV Y VHH-6 | 73 |
| IV.2. ANTICUERPOS FRENTE A VEB, CMV Y VHH-6 EN LOS DOS PRIMEROS AÑOS DE LA VIDA | 76 |
| IV.3. PARTICIPACION DE VEB, CMV Y VHH-6 EN SINDROMES MONONUCLEOSICOS EN POBLACION PEDIATRICA | 84 |
| IV.3.1. Clasificación de los casos en relación con el VEB | 84 |
| IV.3.2. Casos por CMV | 94 |
| IV.3.3. Casos por VHH-6 | 95 |
| IV.4. VALORACION DE LA CUANTIFICACION DE IgG ANTI- VCA COMO MARCADOR DE LA INFECCION RECIENTE POR EL VEB | 97 |
| IV.5. APLICACION DE LA PRESENCIA DE IgG FRENTE AL ANTIGENO TEMPRANO DEL VEB COMO MARCADOR DIAGNOSTICO DE LA INFECCION RECIENTE POR EL VEB | 100 |
| IV.6. APLICACION DE ESTUDIOS DE AVIDEZ DE IgG AL DIAGNOSTICO DE MI POR VEB | 106 |
| IV.7. VALORACION DE LA PRESENCIA DE AH EN EL DIAGNOSTICO DE LA MI | 112 |
| IV.8. VALORACION GLOBAL DE LOS MARCADORES SEROLOGICOS DE INFECCION POR EL VEB | 116 |
| IV.9. INCIDENCIA DE REACCIONES HETEROLOGAS ENTRE VEB, CMV Y VHH-6 EN MI | 120 |
| IV.10. APLICACION DEL PEPTIDO SINTETICO p62 AL DIAGNOSTICO DE LAS INFECCIONES POR VEB | 125 |
| IV.11. APLICACION DE LOS ENSAYOS QUE DETERMINAN IgG E IgM FRENTE A LAS PROTEINAS RECOMBINANTES p54 Y p138 DE EA E IgG FRENTE A LA p72 DE EBNA | 129 |
| IV.12. MARCADORES SEROLOGICOS DE INFECCION POR VEB EN NIÑOS VIH POSITIVOS, EN RELACION CON LA PRESENCIA DE NEUMONIA INTERSTICIAL LINFOIDE | 131 |
| V. DISCUSION | 134 |
| V.1. SEROEPIDEMIOLOGIA DE LAS INFECCIONES POR VEB, CMV Y VHH-6 | 135 |
| V.2. PARTICIPACION DE VEB, CMV Y VHH-6 EN SINDROMES MONONUCLEOSICOS EN LA INFANCIA | 143 |
| V.3. MARCADORES SEROLOGICOS DE INFECCION POR VEB | 147 |
| V.3.1. Anticuerpos heterófilos | 147 |
| V.3.2. Marcadores serológicos específicos | 149 |
| V.4. REACCIONES HETEROLOGAS ENTRE VEB, CMV Y VHH-6 EN SINDROMES MONONUCLEOSICOS | 161 |
| V.5. RELACION DEL VEB EN LA PRODUCCION DE NEUMONIA INTERSTICIAL LINFOIDE EN NIÑOS VIH POSITIVOS | 168 |
| VI. CONCLUSIONES | 173 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 178 |

I. INTRODUCCION

I.1. LOS VIRUS. CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES Y BIOLOGICAS

I.1.1. CLASIFICACION Y NOMENCLATURA

Los tres virus objeto del presente estudio pertenecen a la familia *Herpesviridae* (Tabla I.1), estando incluidos en dos subfamilias diferentes. El virus Epstein-Barr (VEB) (sinónimo: virus herpes humano 4), pertenece al género *Lymphocryptovirus* de la subfamilia *Gammaherpesvirinae*. El citomegalovirus (CMV) humano (sinónimo: virus herpes humano 5) pertenece al género *Cytomegalovirus* de la subfamilia *Betaherpesvirinae*, subfamilia que también incluye al virus herpes humano 6 (VHH-6) (The Herpesvirus Study Group, 1992). La familia *Herpesviridae* comprende otros virus humanos (Tabla I.1.): los virus herpes simplex 1 (VHS-1) y 2 (VHS-2), y el virus varicela-zóster (VVZ), los tres agrupados en la subfamilia *Alphaherpesvirinae*. Recientemente se ha descrito otro herpesvirus humano, provisionalmente denominado virus herpes humano 7 (Frenkel y cols., 1990), todavía no encuadrado en ninguna subfamilia. El virus herpes simio B puede infectar al hombre, aunque no es su huésped natural.

Tabla I.1. Clasificación de los virus herpes humanos

| subfamilia | género | especie tipo | virus humanos |
|------------|-------------------|--------------|----------------|
| Alpha | Simplexvirus | VHS-1 | VHS-1 VHS-2 |
| | Varicellovirus | VVZ | VVZ |
| Beta | Cytomegalovirus | CMV | CMV VHH-6 |
| Gamma | Lymphocryptovirus | VEB | VEB |

Aparte de la arquitectura del virión, primera característica en que se basa la inclusión de virus en la familia, todos los herpesvirus conocidos comparten una serie de características biológicas (Roizman, 1991):

1. Especifican enzimas y otros factores implicados en la síntesis de ácidos nucleicos (ADN polimerasa, helicasa, primasa, proteína de unión al origen), al menos una proteasa, y un número variable de proteínas quinasas.

2. La síntesis del ADN viral, así como el ensamblaje de las cápsidas tiene lugar en el núcleo, y la adquisición de la envuelta es a través de la membrana nuclear.

3. La producción de virus infeccioso está acompañada por muerte celular irreversible, y

4. Son capaces de establecer una infección latente. En las células que contienen virus latente, los genomas virales toman la forma de moléculas circulares cerradas, y sólo se expresa una pequeña parte de los genes virales.

La clasificación en las tres subfamilias está basada fundamentalmente en diferencias en las características biológicas (Roizman y cols., 1981). En lo que se refiere al tipo celular en el que se establece la infección latente, los *Alphaherpesvirinae* establecen latencia en ganglios sensoriales, en tanto que los miembros de la subfamilia *Gammaherpesvirinae* lo hacen en linfocitos B o T, y los *Betaherpesvirinae* en células linforeticulares y probablemente en muchos otros tejidos. En el caso del VEB está claro que el estado latente se produce en linfocitos B, mientras que en CMV no se conoce en la actualidad el lugar en que se establece la latencia, aunque se ha postulado que pueda ser en cualquiera de los órganos en que se produce infección.

Por otra parte, en tanto que los *Alphaherpesvirinae* muestran ciclo reproductivo corto, rápida diseminación en cultivo, y destrucción eficiente de las células infectadas, los *Betaherpesvirinae* tiene un ciclo replicativo largo y la infección de célula a célula en cultivo es lenta, produciendo agrandamiento de las células infectadas (citomegalia) (Roizman y cols., 1981).

No todos los herpesvirus muestran el mismo grado de especificidad de huésped, variando en las diferentes subfamilias: para el CMV no se conoce un modelo experimental animal, en tanto que el VEB puede infectar

algunos primates subhumanos, aunque sólo se ha conseguido reproducir parcialmente la mononucleosis infecciosa (MI).

Se conocen dos tipos de VEB, que difieren en el antígeno nuclear (EBNA) [*Epstein-Barr nuclear antigen*]-2, que se expresa en la infección latente (Cohen, 1993). Ambos tipos parecen ser igualmente prevalentes, y se han identificado coinfecciones por ambos (Sixbey y cols., 1989). En lo que se refiere al CMV, se conocen múltiples cepas diferentes, que varían tanto en el tamaño del genoma, como en el número de repeticiones terminales en el genoma (Stinski, 1990), aunque no se han encontrado diferencias en su capacidad de producir enfermedad. Por último, se conocen dos grupos de VHH-6, basados en diferencias en el polimorfismo genético, en las características de crecimiento *in vitro* y en la reactividad frente a anticuerpos monoclonales. El grupo A, cuya cepa tipo es la GS, está fundamentalmente asociado a síndromes linfoproliferativos (Salahuddin y cols., 1986), y el grupo B, cuya cepa patrón es la Z29, se asocia con exantema súbito (DiLuca y cols., 1992) y síndromes febriles (Dewhurst y cols., 1993).

I.1.2. ESTRUCTURA

La inclusión de virus en la familia *Herpesviridae* está basada en la arquitectura del virión (The Herpesvirus Study Group, 1992). Un virión típico está constituido por cuatro

estructuras bien definidas.

1. Una región central, core o nucleoide, que contiene el genoma viral, constituido por una molécula lineal de ADN de doble banda, en ocasiones de forma toroidal.

2. Una cápsida icosadeltaédrica, que junto con el core constituye la nucleocápsida. La cápsida está formada por 162 capsómeros, de los que 150 son de sección exagonal y tienen un agujero a lo largo del eje, en tanto que los 12 restantes son de sección pentagonal, ocupando los doce vértices del icosaedro.

3. Alrededor de la nucleocápsida existe un material amorfo, en cantidad variable, que constituye el tegumento.

4. Por último, existe una envuelta, adquirida de la envuelta nuclear de la célula huésped, que contiene numerosos peplómeros de glicoproteínas virales.

El tamaño de los viriones varía según diferentes estudios entre 120 y 300 nm. Esta variabilidad puede ser debida a dos causas (The Herpesvirus Study Group, 1992): por una parte, el tegumento puede estar presente en cantidad variable, aunque la más probable causa es la falta de integridad de la envuelta. Los viriones con la envuelta intacta son impermeables a la tinción negativa, y mantienen un tamaño uniforme, esférico, en tanto que aquéllos que la

tienen dañada son permeables a la tinción negativa, y tienen aparentemente forma irregular y diámetro mayor.

I.1.3. ESTRUCTURA DEL GENOMA

El genoma de los herpesvirus consiste en una única molécula de ADN de doble banda, cuyo tamaño varía entre 120 y 220 miles de pares de bases (kb), y con un contenido de G+C variable entre el 32% y el 75% (Roizman, 1990). La estructura de los genomas de los virus herpes se conoce con cierto detalle. En la **Figura I.1** se muestran esquemáticamente las estructuras de los genomas de VEB, CMV y VHH-6.

El genoma de VHH-6 tiene un tamaño de 162 kb, y un contenido en G+C del 42%. Presenta repeticiones directas en ambos extremos, que pueden variar en tamaño, y una gran secuencia única (Lindquister y Pellet, 1991). El de CMV, por otra parte, tiene un tamaño de 229 kb, con un contenido en G+C del 57%, y consta de dos fragmentos únicos (UL y US), cada uno de ellos flanqueado por repeticiones terminales invertidas (Stinski, 1990). Existen cuatro isómeros del genoma de CMV, estando presentes en igual proporción, variando en ellos la orientación de los fragmentos UL y US (Kilpatrick y Huang, 1977). El genoma de VEB tiene un tamaño de 172 kb, con un contenido de G+C del 60% (Baer y cols., 1984). Existen cepas con deleciones que afectan al fragmento U2, que codifica para la proteína

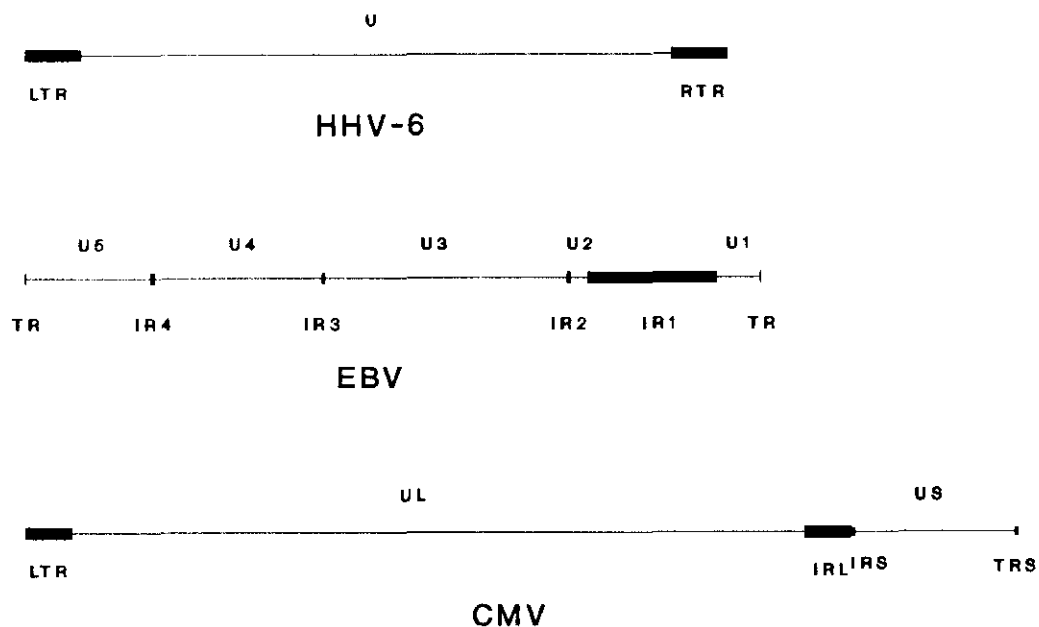


Figura I.1. Estructura de los genomas de EBV, HHV-6 y CMV

EBNA-2; tal delección se da en cepas no transformantes, como la P3HR1 (Rowe y cols., 1985). Aunque se pensó que la cepa P3HR1 era fruto de un accidente de laboratorio, recientemente se han obtenido aislados salvajes de cepas con esta delección (Sixbey y cols., 1991).

I.1.4. CARACTERISTICAS BIOLOGICAS DEL VEB

La principal característica biológica de los virus herpes es la capacidad de producir una infección latente, como consecuencia de la infección primaria. En el caso del VEB, el conocimiento de los fenómenos que ocurren durante

la latencia permite el establecimiento de diversos aspectos de la patogenia de la infección. Por otra parte, fruto del estado de latencia y de la inducción al estado lítico, se produce la síntesis de diversas proteínas con actividad antigénica de gran importancia en el establecimiento de perfiles serológicos para el diagnóstico.

I.1.4.1. CICLO BIOLOGICO DEL VEB

En el caso del VEB se conoce cuál es el tipo celular en que se produce latencia, los linfocitos B. El virus se une a los receptores celulares a través de una glicoproteína de membrana (gp350/220) (Hoffman y cols., 1980), glicoproteína que participa no sólo en la unión sino también en la penetración del virus en la célula (Tanner y cols., 1987). Se produce fusión con la membrana celular, siendo probablemente endocitado en vesículas. Por similitud con otros virus herpes se cree que el citoesqueleto participa en el transporte del ADN viral al núcleo. La célula es activada para abandonar la fase G0 y pasa a la G1. La activación de los linfocitos está acompañada por la síntesis de diversas moléculas de activación. Al entrar el virus en la célula se produce la circularización del genoma, fenómeno que es independiente de la síntesis de proteínas del virus. El genoma puede estar circularizado, que es lo más frecuente, o puede estar integrado en el ADN celular (Matsuo y cols., 1984). A continuación se empiezan a expresar productos génicos virales (antígenos de fase

latente), cuya síntesis no depende de la de ADN viral o celular.

El genoma latente puede ser activado a la expresión, proceso llamado inducción, entrando en el ciclo lítico, por varias causas (Miller, 1990): el cultivo *in vitro*, la inducción con agentes químicos, la composición del medio de cultivo, características físicas, como es el mantenimiento a temperatura subóptima, o el calor, y la radiación ultravioleta. Es en este momento cuando la replicación del virus toma las características citopatogénicas de los herpesvirus. La síntesis de las proteínas es secuencial. Las proteínas inmediatas tempranas se expresan a continuación de la inducción, y su síntesis es independiente de la síntesis de otras proteínas. A continuación se expresan los genes líticos tempranos, independientemente de la síntesis de ADN. Por último, se expresan las proteínas tardías, cuya síntesis es dependiente de la del ADN.

I.1.4.2. ESTRUCTURA ANTIGENICA DEL VEB

Se definen tres clases de sistemas antigénicos: antígenos de la fase latente; antígenos replicativos tempranos, y antígenos tardíos (Miller, 1990).

Los antígenos de fase latente incluyen tanto los antígenos nucleares como la proteína latente de membrana

como el antígeno de membrana detectado por linfocitos (LYDMA) [*lymphocyte detected membrane antigen*]. Los antígenos nucleares del VEB (EBNA) incluyen al menos 6 proteínas diferentes: EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C y EBNA-4. Todas ellas son polimórficas, la mayoría son proteínas de unión al ADN, y la respuesta serológica frente a ellas en la infección humana es variable: mientras que la respuesta frente al antígeno EBNA-1 es universal, sólo se observa respuesta frente a los otros antígenos en algunos individuos. Los sueros humanos reconocen dos dominios en la proteína EBNA-1: la repetición de glicina-alanina, y el extremo carboxilo terminal, que contiene el dominio de unión al ADN (Milman y Hwang, 1987). EBNA-1 tiene un tamaño entre 60 y 85 kd, variando en función de las repeticiones de las estructuras de glicina y alanina.

La función de EBNA-2 parece asociada a la capacidad de transformación (la cepa P3HR1 no expresa esta proteína, y carece de la capacidad transformante) (Rowe y cols., 1985). Se han identificado 2 tipos, excluyentes, de hecho esta proteína sirve de marcador diferenciador de los dos tipos de VEB. La función de los restantes antígenos EBNA (-3A, -3B, -3C, y -4) es desconocida.

La proteína latente de membrana es de muy corta vida media, y parece ser un componente importante del antígeno LYDMA (Thorley-Lawson e Israelsohn, 1987). Este antígeno permite el reconocimiento por parte de las células T de los

linfocitos B infectados, fenómeno desencadenante de gran parte de las manifestaciones clínicas de la MI.

La síntesis de los antígenos tempranos (EA) [*early antigens*] no requiere de la del ADN. Se identifican dos tipos de EA, en función de su solubilidad diferencial al metanol, y de su localización: difuso, en toda la célula, y restringido, de localización citoplásmica. La presencia de anticuerpos frente a EA no se da en todos los sueros que tienen anticuerpos frente al virus; de hecho, se ha considerado la presencia de anticuerpos frente a estos antígenos como un marcador de replicación del virus (Miller, 1990).

El antígeno de la cápsida viral (VCA) [*viral capsid antigen*] se expresa de forma abundante en la infección productiva, e induce anticuerpos detectables durante toda la vida. La proteína mayoritaria es la p160, de localización fundamentalmente nuclear (Vroman y cols., 1985), aunque la más inmunógena en la infección natural es la glicoproteína gp125 (Luka y cols., 1984).

Los antígenos de membrana, se encuentran tanto en la envuelta viral como en membranas intracelulares. La proteína gp350/gp220 es la responsable de la unión a los receptores celulares de las células susceptibles. El componente peptídico de la glicoproteína es el responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes, por lo que

se planteado como un candidato para la producción de vacunas.

I.2. LA MONONUCLEOSIS INFECCIOSA

La primera referencia que existe de la MI se remonta a finales del siglo XIX, cuando se describió por parte de Filatov y Pfeiffer simultánea, pero separadamente, una enfermedad caracterizada por malestar, fiebre, hepatoesplenomegalia, linfadenopatías y dolor abdominal. El establecimiento de la MI como entidad clínica se debe a Sprunt y Evans (1921), quienes describieron seis casos de niños previamente sanos, que mostraban fiebre, linfadenopatías, así como alteraciones en linfocitos mononucleares. Poco después, Downey y McKinlay (1923) proporcionaron una descripción morfológica detallada de los linfocitos atípicos característicos de la MI. Unos años más tarde, Paul y Bunnell (1932) encontraron de forma inesperada títulos altos de aglutininas frente a eritrocitos de cordero en sueros de pacientes con la enfermedad. A continuación, Davidshon (1938) introdujo la adsorción diferencial que mejoraba la especificidad de la detección de estas aglutininas. El primer virus identificado como responsable de casos de MI fue el CMV (Klemola y Kääriäinen, 1965). La relación con el virus responsable del mayor número de casos de síndromes mononucleósicos, el VEB, fue sugerida por Henle y Henle (1968) quienes observaron seroconversión por

inmunofluorescencia indirecta (IFI) frente a VCA del VEB en una técnico de su laboratorio que padecía la enfermedad, y confirmada por varios estudios epidemiológicos. El más clásico de estos estudios es el llevado a cabo en la academia militar de West Point (Hallee y cols., 1974), en el que se observó que cerca de la mitad (201 de 437) de los reclutas que eran seronegativos al virus al ingreso mostraban evidencia de infección por el VEB durante su estancia en la academia, aunque sólo 53 de los infectados (26,4%) presentaron un episodio reconocible de MI. Con la disponibilidad de procedimientos serológicos específicos para los dos virus se observó que un número de casos, variable según la edad de los pacientes estudiados en diferentes estudios, eran producidos por otros agentes. El que más frecuentemente se ha relacionado ha sido el protozoo *Toxoplasma gondii* (Evans, 1978). En los últimos años, se ha encontrado que el VHH-6 puede ser responsable de casos de MI (Bertram y cols., 1988), aunque en la actualidad no está definido el nivel de su participación.

I.2.1. PATOGENIA DE LA MONONUCLEOSIS INFECCIOSA

El período de incubación de la MI por VEB dura entre 3 y 7 semanas (Svedmyr y cols., 1984). El VEB penetra por vía oral. Se une, mediante las glicoproteínas gp350/220 (Hoffman y cols., 1980) a receptores de la superficie de células epiteliales de la orofaringe, en las que se ha identificado un receptor para el virus (Sixbey y cols.,

1987), que es el sitio primario de replicación (Kikuta y cols., 1989). La replicación del virus en esta localización dura toda la fase aguda, puesto que se detecta virus en la saliva de la práctica totalidad de los enfermos (Golden y cols., 1973). A través del anillo linfático de Waldeyer el virus entra en contacto con linfocitos B (Rickinson y cols., 1985), que son infectados por el virus, por medio del receptor CR2, el mismo que une al componente C3d del complemento (Fingerroth y cols., 1984). El virus pasa a la circulación donde produce una activación policlonal de linfocitos B, que es la causa de la síntesis de anticuerpos de amplio espectro de especificidades que se detectan en la fase aguda de la enfermedad, incluyendo los anticuerpos heterófilos (AH). La mononucleosis por CMV produce igualmente un amplio espectro de reactividades, que no incluye a los AH, aunque no tiene capacidad de activación directa *in vitro* de linfocitos B (Rickinson y cols., 1985).

Además de tales reactividades serológicas inespecíficas de la infección por el VEB se produce una respuesta específica a la infección viral, que está dirigida a los antígenos relacionados con el ciclo replicativo; de éstos, es el antígeno de membrana el más importante, puesto que induce anticuerpos neutralizantes, que son los más efectivos a la hora de controlar la diseminación de virus libre (Epstein y Morgan, 1983). La mayor eficacia en el control de la infección se debe, no

obstante, a la inmunidad celular. La mayoría de los linfocitos atípicos que aparecen en el curso de la MI son linfocitos T, fundamentalmente CD8+ (Tosato y cols., 1979). Esta población de linfocitos aparece como consecuencia de la proliferación de linfocitos B que expresan el antígeno LYDMA, e incluye elementos citotóxicos y supresores. El antígeno LYDMA es reconocido por las células T asesinas, en tanto que los linfocitos T supresores actúan controlando la proliferación de los linfocitos B.

Se ha planteado que la mononucleosis es debida a un proceso inmunopatológico desencadenado por la infección viral. Cuando se trata a enfermos con aciclovir se acaba con la excreción del virus, pero no se reduce el número de células transformadas por el virus, ni tiene ningún efecto sobre la sintomatología. El tratamiento con corticosteroides, solos o en combinación con aciclovir, por otra parte, mejora la condición de los pacientes (Andersson y Ernberg, 1988). Una explicación a estos hechos es que la replicación del virus es asintomática, y que la enfermedad está causada por la respuesta inmune frente a los linfocitos B transformados por el virus (Linde, 1992). La producción de grandes cantidades de células T es la responsable de la infiltración que se produce en órganos internos, de la hiperplasia de nódulos linfáticos, así como de la faringitis (Epstein y Achong, 1977).

I.2.3. MANIFESTACIONES CLINICAS

La enfermedad puede comenzar súbitamente, o después de un período prodrómico caracterizado por escalofríos, sudoración, sensación de fiebre, anorexia y malestar. La presentación clínica más frecuente incluye la tríada de dolor de garganta (odinofagia), fiebre y linfadenopatías (Schooley y Dolin, 1990). En la **Tabla I.2.** se presentan los datos de los signos o síntomas más frecuentes en los síndromes mononucleósicos causados por VEB, CMV y VHH-6 (Evans, 1978; Sumaya y Ench, 1985a; Begovac y cols., 1988; Horwitz y cols., 1985; Steeper y cols., 1990).

Independientemente del agente causal, aparece fiebre en la práctica totalidad de los casos. La duración del proceso febril es mayor en la MI por CMV en adultos, que en el resto de casos. El dolor de garganta aparece de forma más frecuente en las producidas por el VEB y en las producidas por CMV en menores de 16 años. La faringitis exudativa es más frecuente en los casos por VEB que en los producidos por CMV; y entre estos últimos, aparece más en niños que en adultos, en los que es un hallazgo altamente infrecuente. La linfadenopatía aparece de forma más esporádica en los casos por CMV en adultos, que en el resto. La esplenomegalia es más frecuente en niños, independientemente del virus responsable de la enfermedad. Por último aparece exantema de forma más frecuente en niños que en adultos, aunque en gran parte de casos como

consecuencia de tratamiento antibiótico con ampicilina o amoxicilina.

Tabla I.2.a. Características clínicas de MI por VEB

| | Grupo de edad | | | |
|--------------------------|---|-------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| | niños mayores y adultos jóvenes ¹ | <4 años ² | entre 4 y 14 años ² | <16 años ³ |
| número: | 1329 | 47 | 66 | 22 |
| FIEBRE (%) | 87 | 90 | 100 | 100 |
| duración media (días) | | 9 | 8 | 9 |
| DOLOR GARGANTA (%) | 82 | 65 | 75 | |
| FARINGITIS EXUDATIVA (%) | | 42 | 58 | 86 |
| LINFADENOPATIAS (%) | 83 | 93 | 94 | 68 |
| ESPLENOMEGALIA (%) | 43 | 80 | 50 | |
| HEPATOMEGALIA (%) | 11 | 60 | 30 | |
| EXANTEMA (%) | 8 | 35 | 18 | |

Tabla I.2.b. Características clínicas de MI por CMV y

VHH-6

| | SINDROME MONONUCLEOSICO CAUSADO POR | | | |
|--------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| | CMV | | | VHH-6 |
| | <16 años ³ | adultos ³ (x=30a) | adultos ⁴ (x=27a) | todos ⁵ (x=22a) |
| número: | 11 | 18 | 82 | 8 |
| FIEBRE (%) | 100 | 100 | 94 | 88 |
| duración media (días) | 9 | 16 | | |
| DOLOR DE GARGANTA (%) | 75 | 33 | 31 | 13 |
| FARINGITIS EXUDATIVA (%) | 45 | 5 | 1 | |
| LINFADENOPATIAS (%) | 73 | 38 | 17 | 63 |
| ESPLENOMEGALIA (%) | 73 | 44 | 29 | 25 |
| HEPATOMEGALIA (%) | 36 | 44 | | |
| EXANTEMA (%) | 36 | 11 | 8 | 0 |

¹Evans, 1978

²Sumaya y Ench, 1985a

³Begovac y cols., 1988

⁴Horwitz y cols., 1985

⁵Steeper y cols., 1990

Antes de que fueran aplicados procedimientos virológicos específicos para el VEB, los síndromes mononucleósicos eran definidos como una enfermedad febril aguda de niños mayores y jóvenes adultos (Evans, 1978). En los últimos años, se ha confirmado que la enfermedad es frecuente en niños en edad preescolar (Sumaya y Ench, 1985a); hoy está reconocido que es una enfermedad frecuente en la infancia y adolescencia, rara en adultos, y altamente infrecuente en los ancianos (Schmader y cols., 1989). Por otra parte, la práctica totalidad de trabajos acerca de síndromes mononucleósicos por CMV se refieren a casos producidos en adultos, con edades medias alrededor de los 30 años (Klemola y cols., 1970, Horwitz y cols., 1985, Begovac y cols., 1988).

Independientemente del agente que produzca la enfermedad, la gran mayoría de los casos remite de forma espontánea a las 3 o 4 semanas del comienzo. El cansancio que produce la MI remite de forma más gradual, de forma que la recuperación completa puede durar unos pocos meses.

I.2.4. COMPLICACIONES DE LA MONONUCLEOSIS INFECCIOSA

Como ya se ha comentado, la gran mayoría de los casos se resuelve de forma espontánea a las pocas semanas del comienzo. En algunos casos, se presentan complicaciones que algunos autores consideran forman parte de la enfermedad aguda, que pueden afectar prácticamente a todos los

órganos.

Aparecen complicaciones neurológicas en menos del 5% de los casos (Grose, 1988). Pueden aparecer meningitis, síndrome de Guillain-Barré y encefalitis. Se ha relacionado la MI por VEB con síndromes neurológicos francamente infrecuentes, como es el síndrome de Alicia en el País de las Maravillas (Eshel y cols., 1987).

Entre las complicaciones respiratorias, el hallazgo más frecuente es la neumonía, que puede aparecer en la infección tanto por VEB (Sumaya y Ench, 1985a) como por CMV (Klemola y cols., 1972).

Las complicaciones cardíacas tanto por VEB como por CMV se pueden considerar como raras, aunque se han descrito frecuentemente, en alrededor el 10% de casos, alteraciones en las ondas T en electrocardiogramas en pacientes de MI (Juel-Jensen, 1992).

Por último, desde el punto de vista hematológico, la MI puede verse complicada por anemia hemolítica y por trombocitopenia.

Sumaya y Ench (1985a) describen complicaciones en el 21,2% de niños con MI causada por el VEB, que afectan al tracto respiratorio (8,8%), al sistema nervioso central (7,1%), hematológicas (4,4%), infecciosas (3,5%), al hígado

(1,8%), renales (glomerulonefritis) y genitales (orquitis) (0,9% cada una).

La mortalidad relacionada con la MI es excepcional, hasta el punto de que hasta 1970 sólo se habían referido 20 casos en la literatura médica (Penman, 1970). En los pacientes inmunocompetentes las causas de muerte son las complicaciones neurológicas, rotura de bazo, infección secundaria, fracaso hepático y miocarditis. Cuando la MI por VEB se produce en enfermos afectados del síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X, o síndrome de Duncan, la mortalidad puede alcanzar a las dos terceras partes de los enfermos (Bartley y cols., 1988).

Más del 95% de los pacientes se recupera con tratamiento sintomático. La administración de corticosteroides mejora la condición clínica de los pacientes, recomendándose en los casos con complicaciones respiratorias, hematológicas, cardíacas o neurológicas. La administración de aciclovir no tiene ningún efecto clínico (Andersson y Ernberg, 1988). Se ha propuesto la amigdalectomía en pacientes en los que la enfermedad tenga una duración mayor a veinte días, o con una excesiva hiperplasia que provoque disnea o disfagia (Bujía y cols., 1992).

I.2.5. DATOS DE LABORATORIO

I.2.5.1. ALTERACIONES HEMATOLÓGICAS

Los hallazgos más frecuentes son leucocitosis, linfocitosis absoluta y relativa y presencia de linfocitos atípicos.

Durante la primera semana de la enfermedad el recuento de leucocitos es normal o ligeramente elevado. En la segunda semana se observa en la mayoría de los casos una leucocitosis mononuclear ligera, generalmente entre 15000 y 25000 células/mm³. Los recuentos de leucocitos en los niños menores de cuatro años son significativamente mayores que en los mayores de esa edad (Sumaya y Ench, 1985a).

Aparecen tanto linfocitosis absoluta (más de 4500 células/ μ l) como relativa (más del 50% de los leucocitos). La linfocitosis relativa es equivalente en los casos de MI producidos por VEB y CMV (Begovac y cols., 1988), así como en los casos causados por VEB en los niños pequeños y mayores (Sumaya y Ench, 1985a).

El hallazgo más característico de la MI lo constituye sin duda la presencia de linfocitos atípicos, que usualmente constituyen el 30% de los linfocitos, aunque el espectro de la linfocitosis atípica es amplio. De hecho, el valor medio de linfocitos atípicos en niños menores de

4 años fue de 18,5% (Sumaya y Ench, 1985a). La descripción realizada por Downey y MacKinlay (1923) continúa siendo vigente. Describieron tres tipos de linfocitos atípicos. Las células del tipo I tienen citoplasma vacuolado basófilo oscuro, un núcleo indentado, con cromatina densa, y con una zona perinuclear más clara. Las del tipo II tiene citoplasma claro, menos vacuolado, y un núcleo redondo. Por último, las del tipo III son más grandes, diferenciándose del tipo I en que el núcleo tiene cromatina finamente granulada, y contiene un nucléolo prominente. El tipo III es similar a las células que aparecen en la leucemia aguda (Mahoney y Fernbach, 1988). Los linfocitos atípicos, sin embargo, no son patognómicos de la MI. De hecho, son varios los síndromes en los que se puede encontrar linfocitosis atípica: rubéola, toxoplasmosis, hepatitis viral aguda, paperas, así como reacciones a algunos fármacos (Schooley y Dolin, 1990).

Las alteraciones hematológicas usualmente se resuelven en pocas semanas, aunque pueden perdurar durante meses, por lo que se plantea la necesidad de una correcta caracterización etiológica de los casos, para el diagnóstico diferencial con la leucemia aguda.

I.2.5.2. OTRAS ALTERACIONES

Son frecuentes las elevaciones en las transaminasas, indicativas de alteraciones de la función hepática, de

forma más frecuente en niños mayores que en los pequeños (Sumaya y Ench, 1985a). En general, sin embargo, las elevaciones no superan las 600 U/dl, y, en cualquier caso, están muy por debajo de la elevaciones que se presentan en los casos de hepatitis producidas por los virus hepatotropos.

Frecuentemente aparecen determinadas alteraciones inmunológicas, algunas importantes desde el punto de vista del diagnóstico de laboratorio, como es la presencia del factor reumatoide (FR) (Klemola y cols., 1970).

I.2.6. RESPUESTA INMUNE

La expresión clínica de la MI es consecuencia de la inmunidad celular. En la fase aguda de la enfermedad se produce una estimulación de linfocitos B. Como respuesta a esta proliferación se produce un incremento en el número de linfocitos T CD8+, que son los linfocitos atípicos característicos de la enfermedad.

Por otra parte, se produce una respuesta de anticuerpos específicos contra el agente que produce la enfermedad. Como una norma general, la respuesta característica que sigue a una infección primaria está constituida por una respuesta IgM, que aparece de forma prácticamente simultánea a la aparición de los síntomas, y que desaparece en unos pocos meses, y por una respuesta

IgG, de ligeramente más tardía aparición y que perdura durante años, probablemente toda la vida. Este esquema es válido para el VCA del VEB, así como para CMV y VHH-6. La MI se diagnostica de forma eficaz detectando la presencia de IgM específica con la técnica adecuada. La aproximación serológica alternativa (seroconversión de IgG específica o de anticuerpos totales) no se suele mostrar eficaz, dado que cuando se dispone de la primera muestra ya suele haber presencia de anticuerpos que impide la detección de seroconversión e incluso de la variación significativa del título de anticuerpos.

Fruto de la propia patogenia de la infección se produce una estimulación policlonal de linfocitos B que tienen capacidad de síntesis de IgM frente a patógenos a los que ha estado expuesto el paciente. Por tanto se pueden detectar reacciones heterólogas específicas frente a varios agentes. Además existen reacciones cruzadas entre los virus objeto de este estudio, que se detectan cuando se mide IgM, que pueden conducir a errores en el diagnóstico. El diagnóstico serológico de la infección por el VEB se puede confirmar utilizando marcadores específicos alternativos, siendo el que combina la ausencia de anticuerpos frente a EBNA con presencia de cualquier otro marcador, usualmente IgG frente a VCA, el más usado.

I.3. METODOS PARA EL DIAGNOSTICO VIROLOGICO DE LAS INFECCIONES POR VEB, CMV Y VHH-6

Existen dos aproximaciones para el diagnóstico específico de las infecciones. Por una parte, el aislamiento y/o identificación del virus o alguno de sus componentes o productos, y por otra, la puesta en evidencia de una respuesta serológica específica. La aplicación de una u otra aproximación depende de varios factores, incluyendo las características de crecimiento de los virus *in vitro*, y por tanto, la facilidad para el aislamiento, la respuesta inmune que induce la infección, y el desarrollo de tecnologías adecuadas para cada una de las aproximaciones.

I.3.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LOS VIRUS

De los tres virus en el que más se ha desarrollado este aspecto del diagnóstico ha sido el CMV, fundamentalmente debido a lo irregular de la respuesta de anticuerpos en diferentes situaciones clínicas: En tanto que en la infección postnatal hay una buena respuesta de anticuerpos, en muchos casos de infección congénita, una de las situaciones en que más necesario es el diagnóstico virológico, no se detecta respuesta IgM específica. El CMV es de crecimiento lento, lo que significa que en cultivo ordinario puede tardar varios días o algunas semanas, por lo que se han hecho intentos para acortar este tiempo. En

este sentido, el ensayo *shell vial*, que consiste en la centrifugación de la muestra sobre una monocapa de fibroblastos humanos en un cubre, seguido de incubación 18 horas, y de tinción por inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales frente a antígenos tempranos, ofrece resultados en uno o dos días, con unos valores de sensibilidad y especificidad equivalentes al aislamiento tradicional (Paya y cols., 1987).

El aislamiento del VEB está muy condicionado por su propia biología. Si bien se han reconocido varios tipos celulares naturalmente susceptibles de infección por el virus, como son linfocitos B o células epiteliales, *in vitro* se reduce el espectro a los linfocitos B, que son transformados por el virus, proceso que tiene dos graves inconvenientes, que son la lentitud y la complicación tecnológica, que hacen que sea un procedimiento inadecuado a la gran mayoría de laboratorios de diagnóstico.

I.3.2. SEROLOGIA

Cuando se produce una infección, y coincidiendo con la aparición de los síntomas, se empieza a detectar una respuesta serológica específica. En general, se puede establecer que la respuesta IgM es más rápida en su aparición así como en su duración que la respuesta IgG, siendo ésta perdurable probablemente durante toda la vida del individuo. Ambos isotipos son los que tienen mayor

significado desde el punto de vista del diagnóstico serológico. Este esquema básico es de aplicación a los tres virus objeto del presente estudio; así se pueden diagnosticar serológicamente infecciones bien detectando IgM específica, bien poniendo en evidencia una seroconversión o aumento significativo del título de IgG o de anticuerpos totales. Como es obvio, esta última alternativa es menos práctica, puesto que requiere el estudio de muestras separadas entre 7 y 15 días, no pudiéndose obtener un resultado rápidamente.

I.3.2.1. METODOS SEROLOGICOS DE APLICACION AL VEB

I.3.2.1.1. ANTICUERPOS HETEROFILOS

Los AH constituyen aún hoy el marcador serológico de MI más utilizado, con el inconveniente de no ser específico de la infección por ninguno de los agentes relacionados con la MI, aunque sí de la enfermedad producida por el VEB. Son autoanticuerpos, fundamentalmente del isotipo IgM (Wollheim y Williams, 1966) que reaccionan contra antígenos presentes en la membrana de eritrocitos ovinos, equinos y bovinos, y otros antígenos, evidentemente no relacionados con el VEB. Los AH son adsorbibles con eritrocitos bovinos, pero no con extracto de riñón de cobayo.

Aparte de la aglutinación de eritrocitos de las tres especies animales citadas, se han intentado otras

aproximaciones, como el uso de ensayos inmunoenzimáticos (Halbert y cols., 1982), o de aglutinación de partículas de látex (Levey y cols., 1980), que han supuesto, sobre todo, más facilidad en la interpretación de resultados. Los casos en niños pequeños cursan más frecuentemente sin presencia de AH, y tienen títulos significativamente más bajos que los que se producen en niños mayores y adultos.

I.3.2.1.2. RESPUESTA SEROLOGICA ESPECIFICA

Existen una serie de antígenos específicos del virus que inducen respuestas serológicas que definen el estado de un paciente con respecto a la infección (**Figura I.2.**). La detección de IgG frente al VCA define una exposición previa al virus; por otro lado, la detección de IgM frente a este antígeno indica infección reciente. La detección de anticuerpos frente a EBNA es igualmente indicativa de infección pasada, y su ausencia en presencia de cualquier otro marcador, de infección reciente. La reactividad frente a EA, por último, es un marcador que define la replicación viral. El uso de tales marcadores en combinación permite establecer el momento en que se ha producido la infección. Así, en el caso de una infección primaria cabe esperar el patrón típico de presencia de IgG e IgM anti-VCA y ausencia de anticuerpos frente a EBNA. La presencia de IgG anti-VCA y de anticuerpos frente a EBNA, en ausencia de IgM anti-VCA indicaría infección previa. Por último, cabría esperar

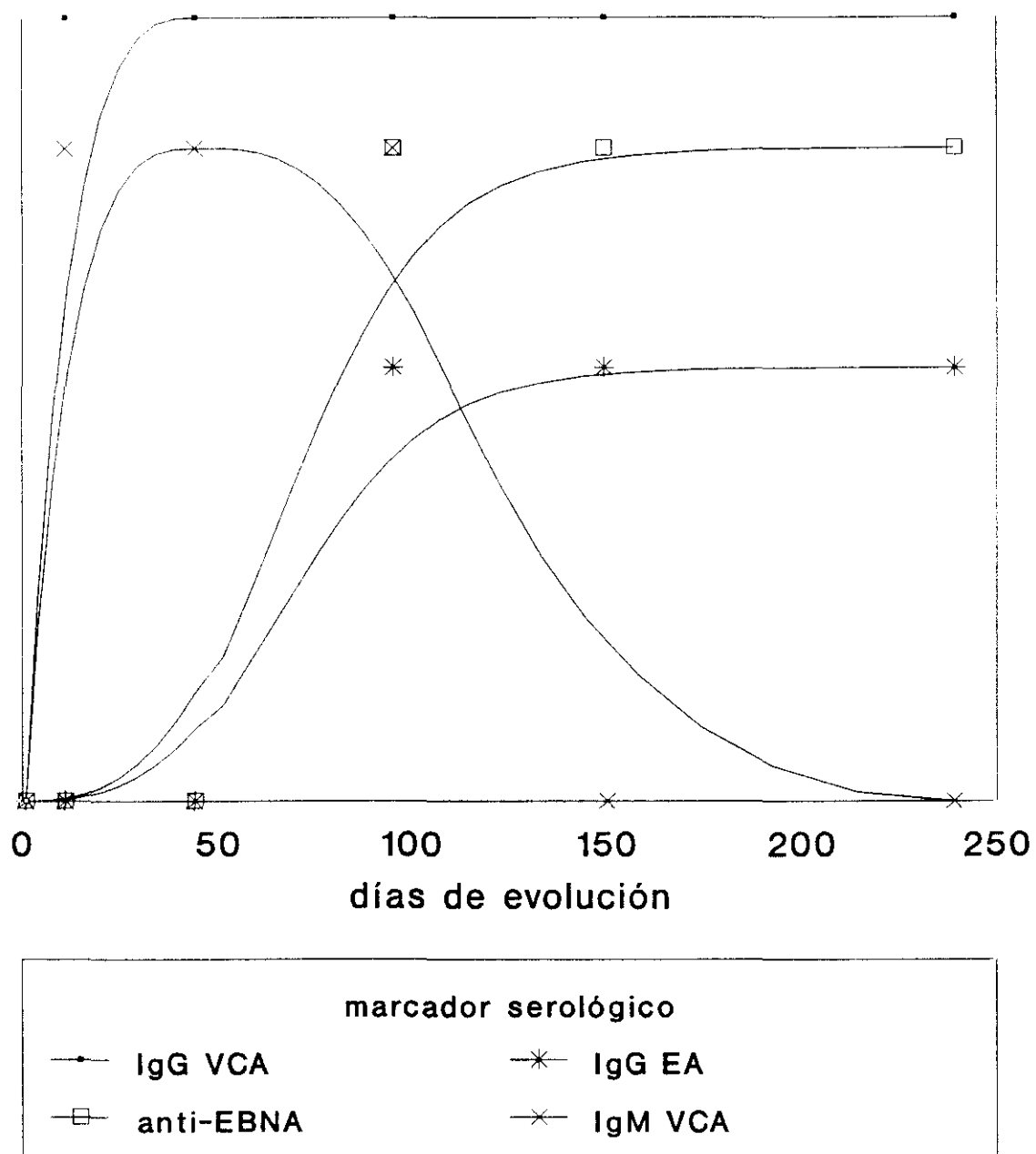


Figura I.2. Evolución de anticuerpos frente a los antígenos de VEB en un caso de MI.

presencia de títulos altos de IgG frente a EA en cualquier situación clínica relacionada con el VEB, fuera infección primaria o reinfección.

Las metodologías utilizadas para el diagnóstico serológico de las infecciones por el VEB están basadas en técnicas de inmunofluorescencia, bien IFI (para IgG e IgM anti-VCA, e IgG anti-EA) o bien anti-complemento (IFAC) (para anticuerpos anti-EBNA). Se ha tratado de aplicar métodos inmunoenzimáticos (ELISA [enzyme linked immunosorbent assay]), más fáciles de desarrollar y de interpretar. Para la detección de IgM anti-VCA se han desarrollado diversos métodos, basados la mayoría en la metodología de ELISA indirecto, con resultados cuando menos discutibles. El principal inconveniente de tales ensayos son las inespecificidades que se derivan de la procedencia del antígeno, usualmente obtenido a partir de extractos de líneas celulares productoras transformadas por el virus, lo que hace que haya un número importante de reacciones contra antígenos presentes en los linfocitos B. Se han intentado diversas aproximaciones para obtener antígenos específicos.

En primer lugar, se intentó la aplicación de un método de captura anti- μ , utilizando un antígeno purificado marcado con peroxidasa, cuyo uso, en combinación con otros marcadores de infección por el VEB, mostró resultados prometedores (Schmitz, 1982), aunque el ensayo no ha tenido continuidad.

Otra aproximación consistió en el uso de la proteína de la cápsida de 125 kd, purificada con anticuerpos monoclonales, con lo que se obtuvo una sensibilidad equivalente a la de la IFI (Luka y cols., 1984). Estudios posteriores ofrecieron un valor de sensibilidad inferior (de Ory y Echevarría, 1989). Una posible explicación a la menor sensibilidad de tal método de ELISA con respecto a la IFI para la medida de IgM anti-VCA es que determinadas respuestas IgM que se detectan utilizando células infectadas están dirigidas contra antígenos de membrana, y no se detectan cuando se usa antígeno purificado a través de anticuerpos monoclonales (Qualtiere y cols., 1982).

Se ha tratado de aplicar ensayos de ELISA utilizando bien péptidos sintéticos o proteínas recombinantes que reproducen epítomos de antígenos diferentes a VCA. En concreto se han utilizado péptidos que representan epítomos del antígeno EBNA-1 (Smith y cols., 1986), así como combinaciones de diversas proteínas recombinantes del antígeno temprano y del antígeno nuclear (Wutzler, 1991), que han mostrado reactividad con sueros de pacientes con MI.

Otro procedimiento alternativo es la IFI que usa como antígeno proteínas recombinantes expresadas en células eucariotas; en la actualidad se dispone sólo de limitada información acerca de sus características de

funcionamiento.

De cualquier forma, no se ha conseguido encontrar hasta el momento ningún tipo de ensayo que permita sustituir a las técnicas de anticuerpos fluorescentes para los estudios serológicos frente a VEB.

I.3.2.2. METODOS SEROLOGICOS DE APLICACION AL CMV

Antes de la disponibilidad de los ensayos para la detección rápida del CMV y de los ensayos para la identificación de anticuerpos específicos del isotipo IgM, el diagnóstico de la infección por CMV se ha realizado empleando técnicas para la detección de seroconversión de anticuerpos totales, las más utilizadas la de fijación del complemento (FC) y hemaglutinación pasiva, con los inconvenientes ya citados de lentitud en la obtención de resultados. La aplicación de técnicas que permiten la identificación de los diferentes isotipos, ha permitido el diagnóstico serológico rápido, por detección de IgM, fundamentalmente con técnica de ELISA. En la actualidad existe un número amplio de ensayos de ELISA para la detección de IgM específica, tanto indirectos como de captura anti- μ , que permiten el diagnóstico con un alto grado de fiabilidad.

La aplicación de anticuerpos frente a diferentes antígenos del CMV (tempranos, de membrana) no ofrece

ventajas con respecto a la detección de IgM específica (Ho, 1991). Igual sucede en lo que se refiere a la aplicación de otros isotipos. Morris y cols. (1985) encuentran que el 40% de mujeres seropositivas al virus muestran IgA específica por lo que su detección carece de utilidad. Por otra parte Nielsen y cols. (1987) usando ensayos de captura de cadenas pesadas encuentran que la detección de IgE específica es más sensible que la de IgM al estudiar muestras de niños con infección congénita por el virus, aunque no está bien establecida su utilidad en otras infecciones por el virus.

I.3.2.3. METODOS SEROLOGICOS DE APLICACION AL VHH-6

La metodología serológica primero aplicada al diagnóstico de infecciones por VHH-6 fue la IFI usando linfocitos de sangre de cordón infectados (Salahuddin y cols., 1986), aunque pronto fue evidente la existencia de resultados falsos positivos (Kruger, 1988), que se obviaban con la utilización de IFAC (Lopez y cols., 1988). Dada la dificultad de obtención de linfocitos de sangre de cordón que permitan ensayos reproducibles, se utilizan en la actualidad células HSB2 para las determinaciones de los isotipos IgG e IgM frente al VHH-6.

En la actualidad se han reconocido al menos tres tipos de antígenos, en cuanto a su localización celular (Biberfeld y cols., 1988), encontrándose que los

anticuerpos frente a antígenos nucleares y de membrana son más frecuentes que los dirigidos contra antígenos citoplásmicos (Cuillard y cols., 1992). Estos hechos han servido para plantear que la respuesta de anticuerpos frente al VHH-6 pueda ser tan compleja como la que se produce frente al VEB.

Se han aplicado igualmente métodos de ELISA para la determinación de anticuerpos frente al VHH-6 (Dahl y cols., 1990, Parker y Weber, 1993). La detección de IgM frente a VHH-6, utilizando virus crecido en la línea HSB2 muestra utilidad en el diagnóstico serológico de infección por el virus en casos de exantema súbito, aunque con ciertas reservas en lo que se refiere a la especificidad (Parker y Weber, 1993).

II. OBJETIVOS

La infección por un virus induce en algunos casos una respuesta de anticuerpos que confiere inmunidad duradera para toda la vida. En el curso del embarazo, los anticuerpos de la madre se transfieren al feto, de forma que el niño es en general inmune a la infección por el virus correspondiente mientras tenga niveles detectables de anticuerpos específicos. Cuando, al transcurrir de los meses, los anticuerpos disminuyen y caen a niveles indetectables, el niño es susceptible de infección. Es un hecho relativamente frecuente que algunas infecciones víricas cursen de forma inaparente, especialmente en niños muy pequeños, en los que una infección vírica puede ocurrir sin sintomatología clínica, o cursar con una clínica inespecífica. El conocimiento de la edad a la que se producen las infecciones es un dato importante para interpretar la epidemiología de los virus.

Por otra parte, la relación virus - enfermedad está en algunos casos bien establecida; tal es el caso de la MI con el VEB. Sin embargo, son frecuentes los casos de tal síndrome negativos al virus, por lo que es importante conocer la incidencia relativa de otros virus en la producción de mononucleosis.

La detección de AH ha sido, y aún es hoy, el procedimiento serológico más empleado para el diagnóstico de las infecciones por el VEB. En la actualidad se dispone de métodos rápidos, como es la utilización de partículas

de látex sensibilizadas con antígenos de membrana de eritrocitos, siendo su valoración importante de cara a su aplicación.

Para el diagnóstico serológico específico de las infecciones por el VEB se utiliza en la actualidad como procedimiento más frecuente la detección de IgM específica anti-VCA. Como métodos alternativos se han planteado otros (determinación cualitativa de IgG frente a VCA en ausencia de anticuerpos anti-EBNA, determinaciones cuantitativas de IgG anti-VCA y de IgG frente a EA) que mejoren el rendimiento.

En los últimos años se han aplicado otras aproximaciones serológicas al diagnóstico de las infecciones por el VEB, para mejorar la especificidad de los ensayos. Tales métodos alternativos incluyen ensayos en fase sólida que utilizan como antígenos péptidos sintéticos o proteínas recombinantes, o métodos que permiten la caracterización de la avidez de la IgG específica anti-VCA.

El diagnóstico de las infecciones producidas por VEB, CMV y VHH-6 está complicado por la existencia relativamente frecuente de reacciones heterólogas. Es importante conocer la frecuencia de tales reacciones, así como la búsqueda de posibles soluciones que permitan la correcta identificación etiológica.

Por último, la infección por el VEB cuando se produce en pacientes inmunodeprimidos puede conducir a enfermedad importante, siendo en ocasiones difícil su diagnóstico.

Con los planteamientos esbozados, los OBJETIVOS concretos de la presente tesis son:

PRIMERO. Estudio de la seroprevalencia en población adulta frente a VEB, CMV y VHH-6.

SEGUNDO. Estudio de la pérdida de los anticuerpos adquiridos pasivamente de la madre frente a los tres virus, y del momento en que se empiezan a detectar individuos seropositivos.

TERCERO. Estudio de la incidencia de los tres virus en la producción de MI en población pediátrica.

CUARTO. Valoración de la aplicación de métodos serológicos clásicos para el diagnóstico de infección por el VEB en síndromes mononucleósicos en niños, incluyendo la detección de AH y marcadores serológicos específicos.

QUINTO. Valoración de la aplicación de nuevas aproximaciones serológicas para el diagnóstico de infección por el VEB, incluyendo el uso de péptidos sintéticos y proteínas recombinantes, y los ensayos de avididad de IgG.

SEXTO. Estudio de la incidencia y del significado de las reacciones heterólogas entre los tres virus en los síndromes mononucleósicos en niños.

SEPTIMO. Estudio de la respuesta serológica específica frente a VEB en niños VIH positivos con síndromes linfoproliferativos.

III. MATERIALES Y METODOS

III.1. MUESTRAS

III.1.1. Seroprevalencia frente a VEB, CMV y VHH-6

La seroprevalencia frente a VEB y CMV se ha determinado utilizando 304 muestras de suero, procedentes de donantes altruístas de sangre (104 muestras), así como de mujeres embarazadas (200 muestras), con edades comprendidas entre 16 y 42 años (media 28,5 años). Para el estudio frente al VHH-6 se han analizado 186 de las muestras de las mujeres embarazadas.

Los sueros se han conservado a -20°C hasta el momento de su uso.

III.1.2. Anticuerpos IgG frente a VEB, CMV y VHH-6 en los dos primeros años de la vida

Para estudiar la forma en que los anticuerpos transferidos pasivamente por la madre desaparecen en los niños pequeños, y cuándo se empiezan a producir infecciones por los tres virus se han utilizado 266 muestras de suero de niños con edades entre 0 y 2 años, agrupados por edades como se muestra en la **Tabla III.1**. Las muestras fueron recibidas en el C.N.M.V.I.S., para el diagnóstico de infección respiratoria.

Tabla III.1.

| edad (meses) | nº de sueros |
|--------------|--------------|
| 0 - 2 | 24 |
| 2 - 4 | 38 |
| 4 - 6 | 51 |
| 6 - 8 | 31 |
| 8 - 9 | 8 |
| 9 - 16 | 54 |
| 16 - 24 | 60 |
| TOTAL | 266 |

Además, se estudiaron 18 muestras de seguimiento de seis niños recién nacidos tomadas antes de la primera semana, a los 3 y a los 6 meses de vida, así como muestras de sus madres, tomadas al momento del nacimiento.

Las muestras de suero se han conservado a -20°C hasta el momento de su uso.

III.1.3. Implicación de VEB, CMV y VHH-6 en síndromes mononucleósicos infantiles

Se han estudiado sueros de 159 niños (97 varones y 62 hembras, relación 1,6:1), con edades entre 1 y 14 años (edad media 4 años y 7 meses), atendidos en el Hospital del Niño Jesús de Madrid entre enero de 1988 y junio de 1989, que mostraban una sintomatología clínica indicativa de MI. La caracterización clínica de los casos se ha basado en la presencia de tres o más de los siguientes síntomas (Sumaya y Ench, 1985a): fiebre mayor de 38°C , adenopatías

laterocervicales, hepatomegalia (3 cm por debajo del borde derecho), esplenomegalia (3 cm por debajo del borde costal), y faringitis exudativa. La distribución por edades de los pacientes se muestra en la **Tabla III.2.**

Los sueros se han conservado a -20°C hasta el momento de su uso.

Tabla III.2.

| edad (a) | nº casos | niños (%) | niñas (%) |
|--------------|------------|----------------|----------------|
| 1 | 15 | 11 (73,3) | 4 (26,7) |
| 2 | 41 | 29 (70,7) | 12 (29,3) |
| 3 | 28 | 15 (53,6) | 13 (46,4) |
| 4 | 21 | 13 (61,9) | 8 (38,1) |
| 5 | 11 | 9 (81,8) | 2 (18,2) |
| 6 | 9 | 5 (55,6) | 4 (44,4) |
| 7 | 4 | 3 (75) | 1 (25) |
| 8 | 4 | 3 (75) | 1 (25) |
| 9 | 5 | 1 (20) | 4 (80) |
| 10 | 7 | 1 (14,3) | 6 (85,7) |
| 11 | 4 | 2 (50) | 2 (50) |
| 12 | 3 | 1 (33,3) | 2 (66,7) |
| 13 | 5 | 3 (60) | 2 (40) |
| 14 | 2 | 1 (50) | 1 (50) |
| TOTAL | 159 | 97 (61) | 62 (39) |

III.1.4. Valoración de criterios serológicos de infección por VEB

La valoración de marcadores serológicos específicos

alternativos de la infección por el VEB (determinaciones cualitativa y cuantitativa de IgG frente a EA, determinación cuantitativa de IgG frente a VCA, la caracterización de la avidéz de la IgG frente a VCA), así como de los AH se ha llevado a cabo sobre los casos citados en el apartado III.1.3. Una parte de estos casos se ha empleado para la valoración de los ensayos que determinan IgM e IgG frente a las proteínas recombinantes p/54 y p/138 de EA, y de IgG frente a la p/72 de EBNA.

Por otra parte, para la valoración del ensayo que determina IgM e IgG frente al péptido sintético p62 se han empleado 314 muestras de suero, agrupadas como sigue.

i. 249 muestras de suero de pacientes con infección aguda por VEB, con edades comprendidas entre 8 meses y 36 años (media 8 años 4 meses). Todos ellos mostraban IgM anti-VCA, y 160 mostraban además AH.

ii. 11 muestras de suero de adultos con infección por CMV diagnosticada clínicamente y por detección de IgM específica por ELISA indirecto. Ninguno de estos sueros mostraba IgM anti-VCA, ni AH.

iii. 9 muestras de suero de mujeres adultas con infección aguda por rubéola, diagnosticada clínicamente y por detección de IgM específica por ELISA indirecto.

iv. 25 sueros de mujeres embarazadas sanas.

v. 20 sueros de donantes altruistas de sangre.

III.1.5. Marcadores serológicos de infección por VEB en niños positivos al VIH, en relación con la presencia de neumonía intersticial linfoide

Se han estudiado 29 muestras de suero remitidas al Centro Nacional de Biología Celular y Retrovirus, procedentes de 11 niños positivos al VIH, clasificados de acuerdo con la presencia de uno o más de los siguientes criterios (CDC 1987):

- serología persistentemente positiva a VIH a los 18 meses de edad.

- presencia de SIDA clínico.

- detección de antígeno p24 al menos en una muestra de suero.

Cinco de los niños (todos ellos en el estadio P2AC de la enfermedad) presentaron la neumonía intersticial linfoide, de acuerdo con la definición de los CDC (1987), entre los 20 y 24 meses de vida, habiéndose estudiado 13 muestras de suero.

Los 6 restantes estaban en el estadio P2AD2, y se han estudiado 16 sueros.

III.2. METODOS SEROLOGICOS

III.2.1. Métodos serológicos específicos para anticuerpos frente a VEB

III.2.1.1. Determinación de anticuerpos IgG anti-VCA

Se ha llevado a cabo por IFI. Como fuente de antígeno se ha utilizado la línea linfoide humana P3HR1, línea transformada por el VEB (Hinuma y cols, 1967), donada por el Dr. Rafael Fernández Muñoz, Hospital Ramón y Cajal, Madrid. Las células se mantienen en medio de crecimiento (RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal [SBF], 1% de antibióticos y 1% de glutamina) y se subcultivan a la mitad cuando presentan una concentración de $8-10 \times 10^5$ células/ml. Una vez que el cultivo está a la concentración citada, se centrifugan a 1000 rpm durante 10 minutos, se resuspenden en un tampón fosfatos (PBS), pH=7,2, y se vuelven a centrifugar, resuspendiendo el sedimento en PBS, a una concentración 10 veces sobre el volumen original. Con la ayuda de una cámara Neubauer, se ajusta la concentración a 10^6 células/ml, y se colocan 10 μ l de la suspensión en cada pocillo (4 mm de diámetro) de portas de 24 pocillos. Se deja secar al aire, y se fijan en acetona fría (-20°C) durante 5 minutos. Los portas así preparados se conservan

congelados a -20°C en presencia de un desecante, siendo estables durante más de 6 meses. Se utilizan tanto para la medida de IgG anti-VCA como para la identificación de IgG anti-VCA de baja avidez.

Se ha utilizado el procedimiento de Henle y Henle (1966). Los sueros se diluyen 1:8, realizándose diluciones dobles en PBS pH=7,2. En cada test se incorporan un suero control positivo, de título 1:128, y un suero control negativo.

Se inoculan 8 μl de las diluciones a ensayar en pocillos previamente identificados. Se incuban en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos, al final de los cuales se lava con PBS pH=7,2 (2 veces durante 5 minutos cada una). Se secan los portas al aire, añadiéndose a continuación 8 μl de antisuero (de conejo) anti-IgG humana marcado con isotiocianato de fluoresceína (Instituto Behring, Marburgo, Alemania), diluído 1:40 en PBS pH=7,2 con azul de Evans (BioMerieux) diluído 1:5000. Se incuba igual que antes, realizándose tres lavados (de 10 minutos cada uno) con PBS, en agitación, y adicionalmente un lavado rápido con agua destilada. Se monta con glicerina en tampón carbonatos pH=9,6, y a continuación se procede a la lectura en microscopio de epifluorescencia (Nikon Labophot), utilizando una lámpara de mercurio de 50 W (Osram HBO 50), a 200x.

Una reacción se considera positiva, indicando presencia de anticuerpos IgG anti-VCA, si muestra un modelo de fluorescencia igual o superior a la que muestra el punto final del suero control positivo.

III.2.1.2. Determinación de IgM anti-VCA

Se ha llevado a cabo por IFI utilizando un reactivo de origen comercial (EB IgM test, Laboratorios Gull, Salt Lake City, Utah, EEUU). El protocolo de trabajo del fabricante ha sido ligeramente modificado, en el sentido de que las muestras han sido tratadas previamente a su ensayo para la eliminación de la IgG presente en la muestra, con el objeto de evitar la interferencia debida a la presencia simultánea de FR e IgG específica (Johnson y Libby, 1980). Brevemente, el procedimiento seguido es el siguiente: se prepara una predilución 1:10 de la muestra a ensayar y se mezcla con igual volumen de un antisuero (de cordero) anti-IgG humana (RF Absorbens, Instituto Behring). Se mantiene 20 minutos a temperatura ambiente, agitando a los 0, 10 y 20 minutos, y se centrifuga en una centrífuga de microtubos (4224 Centrifuge, ALC, Milán, Italia) a 800 g durante 5 minutos. Se inoculan 20 μ l del sobrenadante, que corresponde a una dilución del suero 1:20, sobre pocillos de portas que contienen células HR1-K, manteniéndose durante 90 minutos en cámara húmeda a 37°C. Se realiza un lavado rápido y otro de 5 minutos con PBS pH=7,2, dejando secar el porta. A continuación se añaden

15 μ l de un antisuero (de cabra) anti-IgM humana marcado con isotiocianato de fluoresceína, pretitulado, incubando igual que antes durante 30 minutos. Se lava como antes añadiendo un lavado con agua destilada, se monta con glicerina en tampón carbonatos pH=9,6, y se lee en microscopio de epifluorescencia (Nikon Labophot), utilizando una lámpara de mercurio de 50 W (Osram HBO 50), a 200x.

La reacción se considera positiva, indicando presencia de anticuerpos IgM anti-VCA, cuando el 5 - 10% de las células muestran fluorescencia intracelular.

Los sueros con resultado no interpretable se vuelven a ensayar diluídos 1:10, considerándose como resultado definitivo el obtenido a esta dilución.

III.2.1.3. Determinación de anticuerpos anti-EBNA

Se ha utilizado la técnica de IFAC, con reactivos de origen comercial (EB NA test, Laboratorios Gull). Los sueros, diluídos 1:10 en PBS, se inactivan por calor en baño de agua a 56°C durante 30 minutos. Se inoculan 15 μ l de las muestras diluídas e inactivadas sobre pocillos de portas que contienen células Raji, manteniéndose 30 minutos a 37°C. Se lavan los portas una vez rápidamente, y a continuación 5 minutos con PBS. Sin dejar secar los pocillos, se añaden 15 μ l de suero de cobayo como fuente

de complemento, diluído 1:40 en tampón fosfatos pH=7,5 que contiene Ca^{++} y Mg^{++} . Se incuba y se lavan los portas como anteriormente. Por último, se añaden 15 μl de antisuero (de cabra) anti-complemento de cobayo marcado con isotiocianato de fluoresceína. Se incuba y se lava en las mismas condiciones, añadiendo un lavado en agua destilada. Se montan y se leen en microscopio de epifluorescencia (Nikon Labophot), utilizando una lámpara de mercurio de 50 W (Osram HBO 50), a 200x.

La reacción es positiva, indicando presencia de anticuerpos anti-EBNA, si se observa fluorescencia de localización nuclear en el 10-20% de las células.

III.2.1.4. Determinación de IgG anti-EA

La presencia de anticuerpos frente a EA se ha determinado por IFI, utilizando un procedimiento de origen comercial (EB EA test, Laboratorios Gull). Se ha realizado un cribado a la dilución 1:10. 15 μl de los sueros diluídos en PBS se inoculan sobre pocillos de porta que contienen células Raji inducidas químicamente para mejorar la expresión de antígeno temprano, evitando la producción de viriones infecciosos. Después de una incubación de 30 minutos a 37°C en cámara húmeda, se lavan los portas, una vez rápidamente y a continuación durante 5 minutos, con PBS, dejando secar al aire. Se añaden 15 μl de antisuero (de cabra) anti-IgG humana marcado con isotiocianato de

fluoresceína. Se incuba y se lava igual que antes, añadiendo un lavado rápido con agua destilada, se deja secar, se monta, y se lee en microscopio de epifluorescencia (Nikon Labophot), utilizando una lámpara de mercurio de 50 W (Osram HBO 50), a 200x.

La reacción se considera positiva, y por tanto existen anticuerpos frente a EA, si el 15 - 25% de las células muestra fluorescencia, bien en citoplasma, o en la célula completa.

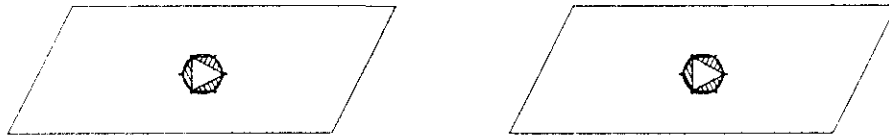
Los sueros con resultado positivo se han vuelto a ensayar a las diluciones 1:40, 1:160, y 1:640, considerándose como el título la dilución más alta que muestra fluorescencia.

III.2.1.5. Caracterización de la avidéz de IgG anti-VCA

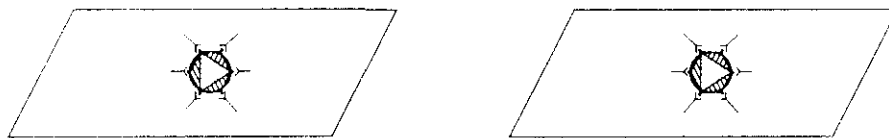
El procedimiento seguido está esquematizado en la **Figura III.1**. Se ha realizado por IFI, siguiendo el método descrito por Gray y Wreghitt (1989). En pocillos de dos portas que contienen células P3HR1, preparados como se especifica en el apartado III.2.1.1., se inoculan las diluciones 1:16, 1:64, 1:256 y 1:1024 de los sueros a ensayar. Se incuban los portas 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Al final de la incubación se lavan los portas de dos formas diferentes: en uno se hace un lavado de 5 minutos con PBS con 8M urea, y otro lavado con PBS; el otro

porta se procesa normalmente, como se especifica en el apartado III.2.1.1. A continuación se procesan ambas portas de forma idéntica a como se especifica en el citado apartado. Una vez completado el procedimiento se procede a la lectura. Se registra el título de anticuerpos IgG anti-VCA en ambas portas. Se considera que la IgG específica que contiene un suero es de baja avidez si existe una disminución del título igual o mayor a 4 veces en el porta tratado con urea, con respecto al procesado normalmente.

Antígeno inmovilizado en fase sólida



Muestra con IgG específica de baja avidéz



Lavado con:

PBS

Urea 8M + PBS



Conjugado anti-IgG humana



**PRESENCIA DE IgG ESPECIFICA DE BAJA AVIDEZ SI HAY REDUCCION
DEL TITULO DESPUES DE TRATAR CON UREA 8M**

**Figura III.1. Procedimiento para la identificación de IgG
de baja avidéz**

III.2.1.6. Determinaciones de IgG e IgM frente al péptido sintético p62

Se ha empleado un reactivo comercial de ELISA indirecto, (Ortho Monolert, Ortho, Alemania), basado en el uso de un péptido sintético (p62) cuya secuencia es AGAGGGAGGAGAGGGAGGAGC, que corresponde a una región de EBNA-1 (Smith y cols., 1986)

En resumen, 100 μ l de las muestras diluídas 1:2 en solución salina-tween, se dispensan en dos pocillos recubiertos con el copolímero sintético (p62), incubándose durante 2 minutos. Se lavan los pocillos dos veces con la solución antes citada, añadiéndose en cada uno de los pocillos anticuerpos monoclonales (de ratón) anti-IgG y anti-IgM conjugados con peroxidasa, incubándose y lavando como antes. En la fase final, se añade el sustrato del enzima (2,2'-azino-di(3-etil-benzotiazolin-sulfonato), ABTS, con peróxido de hidrógeno. La reacción enzimática se para con dodecil sulfato sódico al 1%. La presencia del complejo antígeno-anticuerpo-conjugado se detecta por la aparición de un color verde azulado. La intensidad relativa del color entre los pocillos IgM e IgG se determina leyendo absorbancia a 650 nm.

El caso se considera como una infección reciente por el VEB si el valor de absorbancia obtenido en el pocillo IgM es igual o mayor que el obtenido en el pocillo IgG. Por

el contrario, si el valor del pocillo IgG es mayor que el del pocillo IgM, se considera como una infección pasada. Por último, la ausencia de color en ambos pocillos es indicativa de susceptibilidad de infección por el virus.

III.2.1.7. Determinaciones de IgG e IgM frente a las proteínas recombinantes p/54 y p/138 del antígeno temprano, y de IgG frente a la proteína recombinante p/72 del antígeno nuclear

Se han llevado a cabo por ELISA, utilizando reactivos de origen comercial (Biotest anti-EBV recombinant IgM ELISA, Biotest anti-EBV recombinant EA-IgG y Biotest anti-EBV recombinant EBNA-IgG, Biotest Diagnostics, Alemania). Los tres son procedimientos indirectos de ELISA. Los antígenos inmovilizados en la fase sólida son los antígenos clonados y expresados en *Escherichia coli* p/54 y p/138 de EA y p/72 de EBNA (Hinderer y cols., 1988). La proteína p/54 corresponde al dominio inmunogénico del componente difuso del antígeno temprano, en tanto que la p/138 es una proteína de fusión del mismo complejo antigénico que no es expresada en las células Raji habitualmente empleadas para la determinación de anticuerpos frente al antígeno temprano. Por último, el antígeno p/72 corresponde al 47% del extremo carboxilo del antígeno EBNA-1, que no contiene el copolímero de glicina - alanina, copolímero considerado como responsable de reactividad heteróloga con autoanticuerpos (Venables y cols., 1988).

Brevemente, 200 μ l de las muestras y controles prediluidos 1:21 en PBS que contiene albúmina bovina se inoculan sobre pocillos que contienen los antígenos antes citados. Se incuban 60 min para la determinación de IgM frente a EA y 30 min para las otras dos determinaciones, a 40°C. Se lava 5 veces con PBS que contiene Tween al 25%, inoculando a continuación 100 μ l de anticuerpos monoclonales anti-IgG o anti-IgM humanas, según se quiera detectar IgG o IgM, conjugados a peroxidasa, incubando 30 min a 40°C en todos los casos. Se lava igual que antes, añadiendo 100 μ l de sustrato del enzima (orto-fenilendiamina en tampón de citrato y fosfatos pH=5,5), y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la reacción enzimática se para, por adición de 100 μ l de SO_4H_2 . Se lee contra un pocillo de blanco que incorpora el sustrato del enzima y la solución de parada, a 492/650nm. Se define el valor de corte de igual manera en los tres ensayos, como el valor medio de dos determinaciones de los correspondientes controles negativos + 0,150.

Las tres determinaciones realizadas con las muestras establecen perfiles de anticuerpos, a los que se asignan diferentes estados en relación con la infección por el VEB: ausencia de infección, infección primaria aguda temprana o tardía, reactivación aguda, o infección previa.

III.2.2. Determinaciones de anticuerpos heterófilos

III.2.2.1. Aglutinación de eritrocitos después de adsorción diferencial con estroma de eritrocitos bovinos y extracto de riñón de cobayo

Se ha utilizado un reactivo comercial (IM Absorption kit, Laboratorio Mercia, Reino Unido). Brevemente, 25 μ l de suero sin diluir se mezclan por separado en pocillos adyacentes de portas de cristal con 50 μ l de una suspensión de estroma de eritrocitos bovinos, y de extracto de riñón de cobayo, manteniendo en agitación durante 30 segundos. Se añaden a continuación 50 μ l de una suspensión de eritrocitos de caballo, agitando durante 60 segundos.

La reacción es positiva, indicando presencia de AH, si se observa aglutinación en la muestra de suero incubada con el extracto de riñón de cobayo, y no en la incubada con estroma de eritrocitos bovinos.

III.2.2.2. Aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con glicoproteínas de la membrana de eritrocitos bovinos

Se ha utilizado el reactivo Monolates (Laboratorio Biokit, Barcelona, España). Se mezclan 50 μ l de la muestra sin diluir con una gota (aproximadamente 14 μ l) de una suspensión de partículas de látex sensibilizadas con

glicoproteínas de membrana de eritrocitos bovinos. Se mantiene en agitación a 70 r.p.m. durante 3 minutos, al final de los cuales se observa bajo iluminación de una lámpara incandescente.

La aparición de aglutinación es indicativa de la presencia de AH.

III.2.3. Determinaciones de anticuerpos frente a CMV

III.2.3.1. Determinación de IgM anti-CMV

Se han realizado determinaciones utilizando dos procedimientos.

III.2.3.1.1. Determinación de IgM anti-CMV por ELISA de captura anti- μ utilizando antígeno marcado

Se ha utilizado un reactivo de origen comercial (ELA-CMV, Medac, Hamburgo, Alemania). 100 μ l de los sueros diluidos 1:100 en solución salina-tween se inoculan sobre pocillos de microplaca que contienen antisuero anti-IgM humana, incubándose 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se lava 4 veces con solución salina-Tween, inoculándose 50 μ l de antígeno CMV marcado con peroxidasa. Se incuba y se lava igual que antes, añadiendo un lavado con agua destilada a 4°C. Se añaden 50 μ l de sustrato del enzima (orto-fenilen-diamina), manteniendo 30 minutos a

4°C. Se para la reacción con SO_4H_2 2M, leyéndose la absorbancia a 492/650nm.

Los sueros se consideran positivos si muestran un valor de absorbancia igual o superior al valor medio de absorbancia de tres determinaciones de un control positivo bajo suministrado por el fabricante.

III.2.3.1.2. Determinación de IgM anti-CMV por ELISA indirecto

Se ha realizado utilizando el método Enzygnost-CMV (Instituto Behring). Los sueros se prediluyen 1:20 en PBS-tween. Se añade igual volumen de antisuero (de cordero) anti-IgG humana (RF Absorbens, Instituto Behring), con el objeto de eliminar las interferencias producidas por la presencia simultánea de FR e IgG específica (Johnson y Libby, 1980), agitando e incubando durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los sueros así preparados están diluidos 1:40. 100 μl de las diluciones de los sueros se inoculan en dos pocillos adyacentes de microplaca que contienen, respectivamente, antígeno de CMV y control de antígeno. Se incuba 1 hora a 37°C en cámara húmeda, lavándose 4 veces en PBS-tween. Se añaden a continuación 50 μl de antisuero (de conejo) anti-IgM humana marcado con fosfatasa alcalina, incubando y lavando como antes. Se añaden entonces 100 μl del sustrato del enzima (paranitro-fenil-fosfato, en tampón de dietanolamina con Cl_2Mg 0,05

mmol pH=9,8), manteniendo 45 minutos a temperatura ambiente, al final de los cuales se para la reacción enzimática con la adición de 50 μ l de NaOH 2N. Se lee la absorbancia a 405 nm, sustrayendo el valor del pocillo control al del pocillo con antígeno.

Los sueros se consideran positivos si muestran valores de absorbancia por encima de 0,30.

Los sueros con valores entre 0,20 y 0,30 se vuelven a ensayar, considerándose positivos si muestran valores superiores a 0,20.

III.2.3.2. Determinación de IgG anti-CMV

Se ha llevado a cabo por ELISA indirecto, utilizando un antígeno extraído con glicina, para lo que se ha seguido básicamente el procedimiento de Kettering y cols. (1977). Cuatro frascos tipo Roux de cultivo primario de fibroblastos de pulmón de embrión humano (FP6) cedidos por M.D. Bermúdez de Castro, Servicio de Virología, C.N.M.V.I.S.), mantenidos en BME [*Basic Medium of Eagle*] suplementado con SBF (2%) y antibióticos (1%), se inocularon con uno que mostraba el 100% de efecto citopático, inoculado previamente con la cepa AD 169 del CMV (cedida por A. Tenorio, Servicio de Microbiología Diagnóstica, C.N.M.V.I.S.). Se incubaba a 37°C hasta que muestra efecto citopático al 100% (4 días). Se tripsiniza,

y se centrifuga a 1500 rpm durante 15 min. El sedimento se resuspende 20 veces con respecto al original, en tampón glicina 0,1M pH=9,5. Las células se rompieron mediante ultrasonidos (Ultrasonic Homogenizer, Cole Parmer Instrument Co, EEUU), realizando tres ciclos de sonicación de 10 seg, separados por 5 seg, en hielo picado. Se centrifuga a 4000 rpm durante 30 min, envasándose en alícuotas, y conservando a -70°C. Cuando se tituló en FC, según el método de Grist y cols. (1979), se obtuvo un título de 1:32.

De forma simultánea se ha producido antígeno control, siguiendo el mismo proceso que se especifica en el párrafo anterior, utilizando células FP6 no infectadas.

El análisis de la concentración de proteínas se realizó mediante el método comercial de Pierce (BCA protein assay reagent, Bio Lab), modificado para pequeñas cantidades de muestra y manejo en microplaca. La concentración de proteínas tanto de antígeno como de antígeno control que se adsorbió a cada pocillo de microplaca fue de 0,06 mg en volúmenes de 0,2 ml.

Sobre pocillos adyacentes de microplaca de fondo en U (Nunc, Dinamarca) se adsorbieron 200 μ l, tanto de antígeno como de antígeno control diluido en tampón de carbonatos 0,05M, (pH=9,6), manteniendo 18 horas a 4°C. Se lavaron las placas 4 veces con PBS-Tween (1%), saturando

a continuación con albúmina bovina (Merck) en PBS al 1%, durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas 4 veces con PBS-Tween (1%), estando listas para su uso para la determinación de IgG anti-CMV.

La validación del antígeno se ha realizado utilizando como referencia el ensayo que habitualmente se maneja en el Laboratorio de Serología del Servicio de Microbiología Diagnóstica del C.N.M.V.I.S. (Enzygnost CMV, Instituto Behring). El procedimiento seguido ha sido el mismo que utiliza el procedimiento comercial, básicamente igual al citado en el apartado III.2.3.1.2., con dos salvedades. Primero los sueros se ensayan diluidos 1:40 en PBS-tween, sin pretratamiento previo, y segundo, se emplea un antisuero (de conejo) anti-IgG humana marcado con fosfatasa alcalina. Los criterios de asignación de resultados fueron los mismos que los citados en el apartado III.2.3.1.2. Para la validación del antígeno se utilizó el suero control positivo para IgG frente a CMV del laboratorio, cuyo título en el ensayo de referencia era de 1:1400, así como 56 sueros de mujeres embarazadas de las que 28 eran seropositivas y las 28 restantes seronegativas al CMV. Cuando se ensayó el suero control positivo se obtuvo un título de 1:1280 (absorbancia neta de esta dilución 0,21) (Figura III.2.). Por otra parte al estudiar los 56 sueros de las mujeres embarazadas se encontró una concordancia con el ensayo de referencia del 100%.

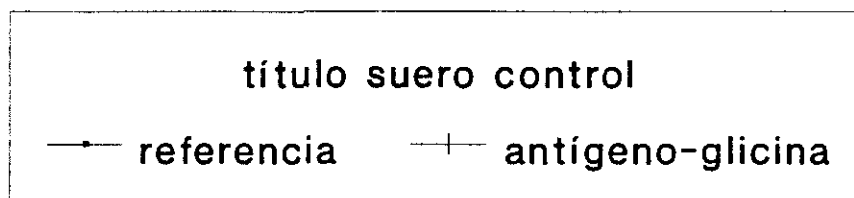
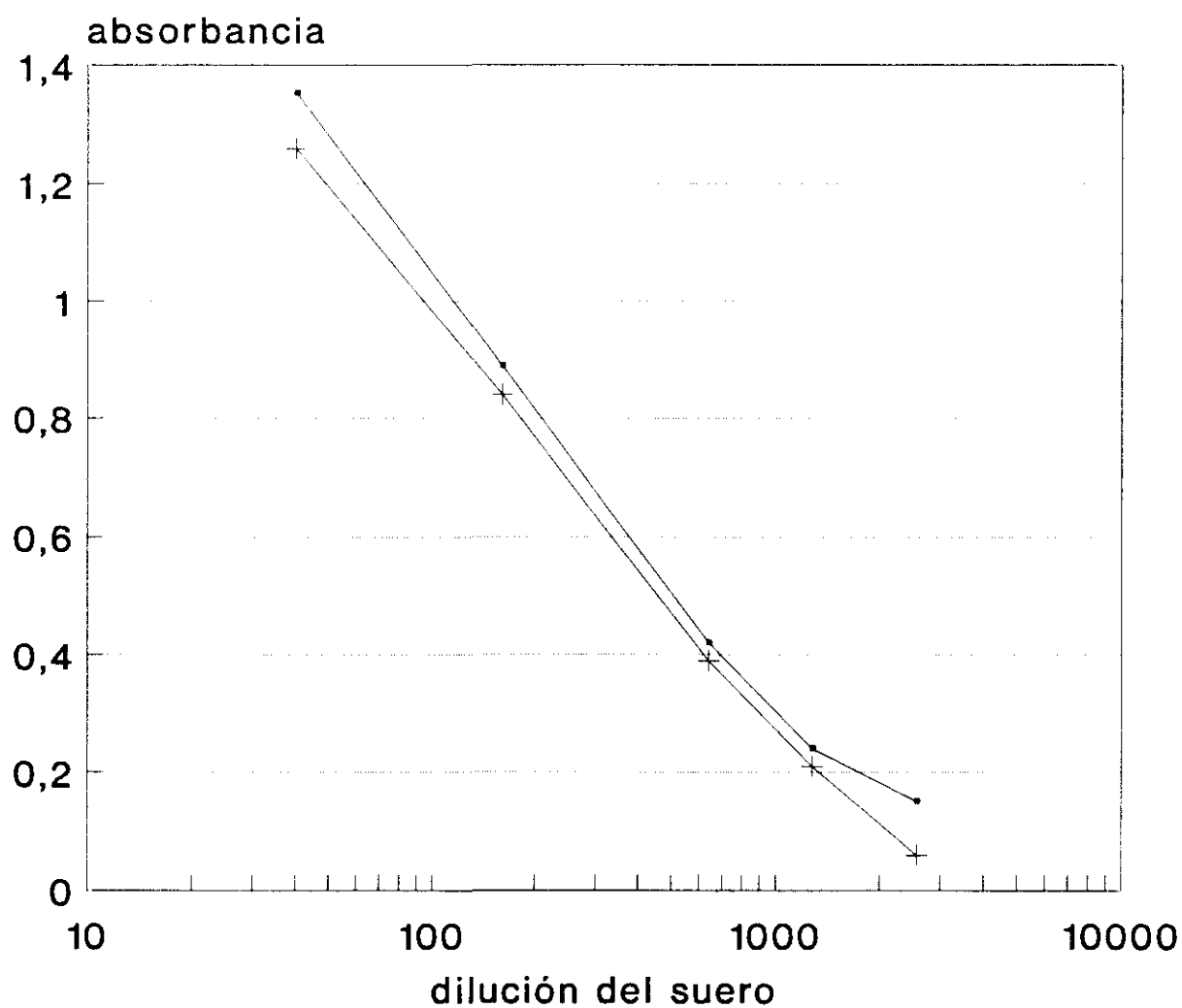


Figura III.2. Validación del antígeno de CMV extraído con glicina para la detección de IgG específica

III.2.3.3. Caracterización de la avidéz de IgG anti-CMV

Se ha llevado a cabo por IFI, utilizando un sistema de inmunofluorescencia automatizada (FIAX) (BioWhittaker, Walkersville, MD, EE.UU.)

El procedimiento utiliza antígeno inmovilizado en un filtro de acetato. Los sueros, controles y calibradores se ensayan diluídos 1:100. Los filtros de acetato se sumergen en tubos que contienen los sueros diluídos, incubándose 1 hora en agitación. Se lavan los filtros durante 5 minutos, sumergiéndose a continuación en tubos que contienen antisuero (de cabra) anti-IgG humana marcada con isotiocianato de fluoresceína. Después de 30 minutos en agitación, los filtros se lavan. Se lee la fluorescencia en un fluorómetro (IDT Fiax Fluorometer 400), obteniéndose los resultados en título Fiax (TF). Los sueros se consideran positivos si muestran $TF > 30$.

Para la caraterización de la avidéz de IgG frente a CMV se ha seguido el procedimiento descrito para la caracterización de avidéz de IgG frente a rubéola (de Ory y cols., 1992) (Figura III.1.). Se desarrollan dos determinaciones de las muestras a ensayar, una según se refiere antes, y otra que incluye un lavado con urea 8M después de completada la reacción antígeno-anticuerpo. Se valora la reducción del TF obtenida en la muestra tratada con urea 8M, considerándose que la muestra contiene

anticuerpos IgG de baja avidez si la reducción es igual o superior al 50%.

III.2.4. Determinaciones de IgM anti-rubéola

Se han realizado por ELISA indirecto, utilizando el reactivo Enzygnost-Rubéola (Instituto Behring). El procedimiento es idéntico al citado en el apartado III.2.3.1.2., con una salvedad: los pocillos de las placas van recubiertos de antígeno de rubéola y su control de antígeno correspondiente.

Los criterios de asignación de resultados son los mismos que los citados en el apartado III.2.3.1.2.

III.2.5. Determinaciones de anticuerpos frente a VHH-6

III.2.5.1. Producción de antígeno

El antígeno de VHH-6 para su uso en IFI se ha obtenido a partir del aislado GS del VHH-6 sobre células HSB2 (tanto el aislado viral como la línea celular amablemente proporcionados por Dr. D. Ablashi, Instituto Nacional del Cáncer, Bethesda, Maryland, EE.UU.).

La línea celular HSB-2 se mantiene en medio RPMI suplementado con SBF (10%), glutamina (1%) y antibióticos (1%), subcultivándose cada cuatro días. Para la producción

de antígeno, se infectan células HSB-2 con células infectadas, en una relación de 9 a 1, en medio RPMI suplementado con SBF (2%), glutamina (1%) y antibióticos (1%). Cuando las células muestran efecto citopático, caracterizado por presencia de células grandes, que aparecen aisladas o rodeadas por otras pequeñas, se procede a la preparación de los portas para inmunofluorescencia. Se centrifuga a 2000 rpm durante 10 minutos la suspensión de células infectadas lavándose una vez con PBS pH=7,2, y centrifugando a continuación en iguales condiciones. Se resuspende la preparación en un volumen de PBS pH=7,2, 10 veces concentrado con respecto al volumen original. Se dispensan 25 μ l de la suspensión en portas de 10 pocillos, de 7 mm de diámetro, dejando secar a temperatura ambiente. Paralelamente se preparan de igual manera células no infectadas, que servirán como control de antígeno. Una vez secos, se fijan los portas en acetona fría (-20°C) durante 5 minutos. Los portas se conservan a -20°C en presencia de un desecante. Se utilizan los portas así preparados para la detección tanto de IgG como de IgM específica, así como para la caracterización de la avidéz de IgG específica.

III.2.5.2. Determinación de IgG frente a VHH-6

Se lleva a cabo por IFI. En pocillos sucesivos que contienen células infectadas y células sin infectar por el virus, se dispensan 20 μ l de los sueros diluídos 1:20 en PBS. En cada determinación se incorporan diluciones en base

2 de suero control positivo (proporcionado por Dr D. Ablashi). Se incuba 30 minutos a 37°C, lavándose en PBS pH=7,2 dos veces durante 5 minutos cada una, dejando secar los portas al aire. Se añaden a continuación 20 µl de un antisuero de cabra anti-IgG humana marcado con isotiocianato de fluoresceína (Instituto Behring), diluido 1:40 en PBS con azul de Evans (BioMerieux) diluido 1:5000. Se incuba igual que antes, realizándose dos lavados, de 5 minutos cada uno, en agitación, añadiendo un lavado rápido con agua destilada. Se monta el porta con glicerina en tampón carbonatos pH=9,6, procediéndose a la lectura en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Labophot), utilizando una lámpara de mercurio de 50 W (Osram HBO 50), a 200x.

Una reacción se considera positiva, indicando presencia de anticuerpos IgG frente a VHH-6, si existe un patrón de fluorescencia específica, observado en las células infectadas, y no en las no infectadas, igual o superior al patrón que muestra el punto final del suero control positivo.

III.2.5.3. Determinación de IgM frente a VHH-6

Se ha llevado a cabo mediante IFI. Las muestras se han tratado previamente al ensayo, con el objeto de eliminar la IgG de la muestra, para evitar los problemas derivados de la presencia de IgG específica y FR (Johnson y Libby,

1980). Para ésto, se han tratado las muestras prediluídas 1:10 en PBS pH=7,2 con igual volumen de un antisuero (de cordero) anti-IgG humana (RF Absorbens, Behring). Se mantiene 20 minutos a temperatura ambiente, agitando a los 0, 10 y 20 minutos, y se centrifuga en una centrífuga de microtubos (4224 Centrifuge, ALC, Milán, Italia) a 800 g durante 5 minutos. Se inoculan 20 μ l del sobrenadante, que corresponde a una dilución 1:20, sobre pocillos adyacentes de portas que contienen células HSB2 infectadas con el VHH-6, y no infectadas, manteniéndose durante 90 minutos en cámara húmeda a 37°C. Se realiza un lavado rápido y otro de 5 minutos con PBS, dejando secar el porta. Se añaden a continuación 20 μ l de un antisuero de conejo anti-IgM humana marcado con isotiocianato de fluoresceína (Dako, Copenhagen), diluído 1:40 en PBS con azul de Evans (BioMerieux) a una concentración 1:5000. Se incuba 30 minutos, en iguales condiciones que antes, realizándose dos lavados, de 5 minutos cada uno, en agitación, añadiendo un lavado rápido con agua destilada. Se monta el porta con glicerina tamponada con carbonatos, pH=9,6, procediéndose a la lectura en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Labophot), utilizando una lámpara de mercurio de 50 W (Osram HBO 50), a 200x.

La reacción se considera positiva, indicando presencia de anticuerpos IgM frente a VHH-6, cuando las células muestran fluorescencia intracelular en el pocillo que contiene células infectadas, y no en las no infectadas.

III.2.5.4. Caracterización de la avidéz de IgG anti-VHH-6

Se ha llevado a cabo por IFI, usando básicamente el mismo procedimiento empleado para la caracterización de la avidéz de IgG anti-VCA (apartado III.2.1.5) (Figura III.1.). Las diluciones empleadas han sido las 1:10, 1:40, 1:160 y 1:640. Se ha considerado que la muestra contenía IgG específica de baja avidéz si ha existido una reducción en el título igual o superior a 4 veces después de lavar con urea 8M.

III.3. Análisis estadístico

Se ha realizado usando el paquete estadístico True Epistat (Epistat Services). Los tests utilizados para el análisis de la significación estadística han sido X^2 y, cuando el tamaño de la muestra lo requirió, el test exacto de Fisher.

IV. RESULTADOS

IV.1. SEROPREVALENCIA FRENTE A VEB, CMV Y VHH-6

En la **Tabla IV.1.** y en la **Figura IV.1.** se muestran los resultados globales obtenidos al estudiar IgG frente a VCA-VEB y frente a VHH-6 por IFI, y anti-CMV por ELISA en mujeres embarazadas y en donantes de sangre.

Tabla IV.1.

Resultados obtenidos al estudiar anticuerpos anti-VCA VEB, anti-CMV, y anti-VHH-6 en donantes, y en mujeres embarazadas

| | número de muestras | número (%) de positivos a: | | |
|---------------------|--------------------|----------------------------|------------|-----------------|
| | | VEB | CMV | VHH-6 |
| Donantes de sangre | 104 | 103 (99) | 78 (75) | nd ¹ |
| Mujeres embarazadas | 200 | 195 (97,5) | 162 (81) | 159 (85,4)* |
| TOTAL | 304 | 298 (98) | 240 (78,9) | 159 (85,4)* |

¹nd: no determinado

*Resultados sobre 186 sueros

Cuando se estudian anticuerpos IgG frente a VCA-VEB en las 104 muestras de suero de donantes de sangre se ha obtenido resultado positivo en 103 (99,04%). Entre las mujeres embarazadas estudiadas se ha logrado resultado positivo en 195 muestras de las 200 estudiadas (97,5%).

Por otra parte, al estudiar anticuerpos frente a CMV se ha encontrado resultado positivo en 78 de los donantes de sangre (75%), así como en 162 de las 200 mujeres

embarazadas (81%).

Por último, cuando se estudia IgG anti-VHH-6 en mujeres embarazadas se encontró resultado positivo en 159 de las 186 muestras estudiadas (85,4%).

La diferencia entre los porcentajes de seropositividad frente a VEB y CMV fue estadísticamente significativa, tanto en donantes como en embarazadas como en el total ($P < 0,01$). Igual sucedió entre VEB y VHH-6 ($P < 0,01$). No se observaron diferencias entre CMV y VHH-6.

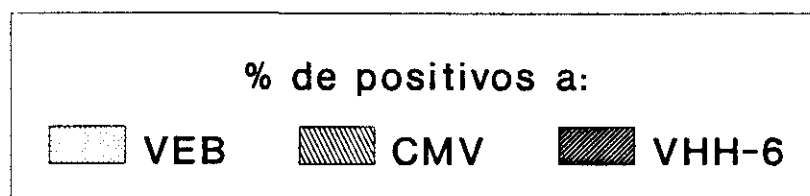
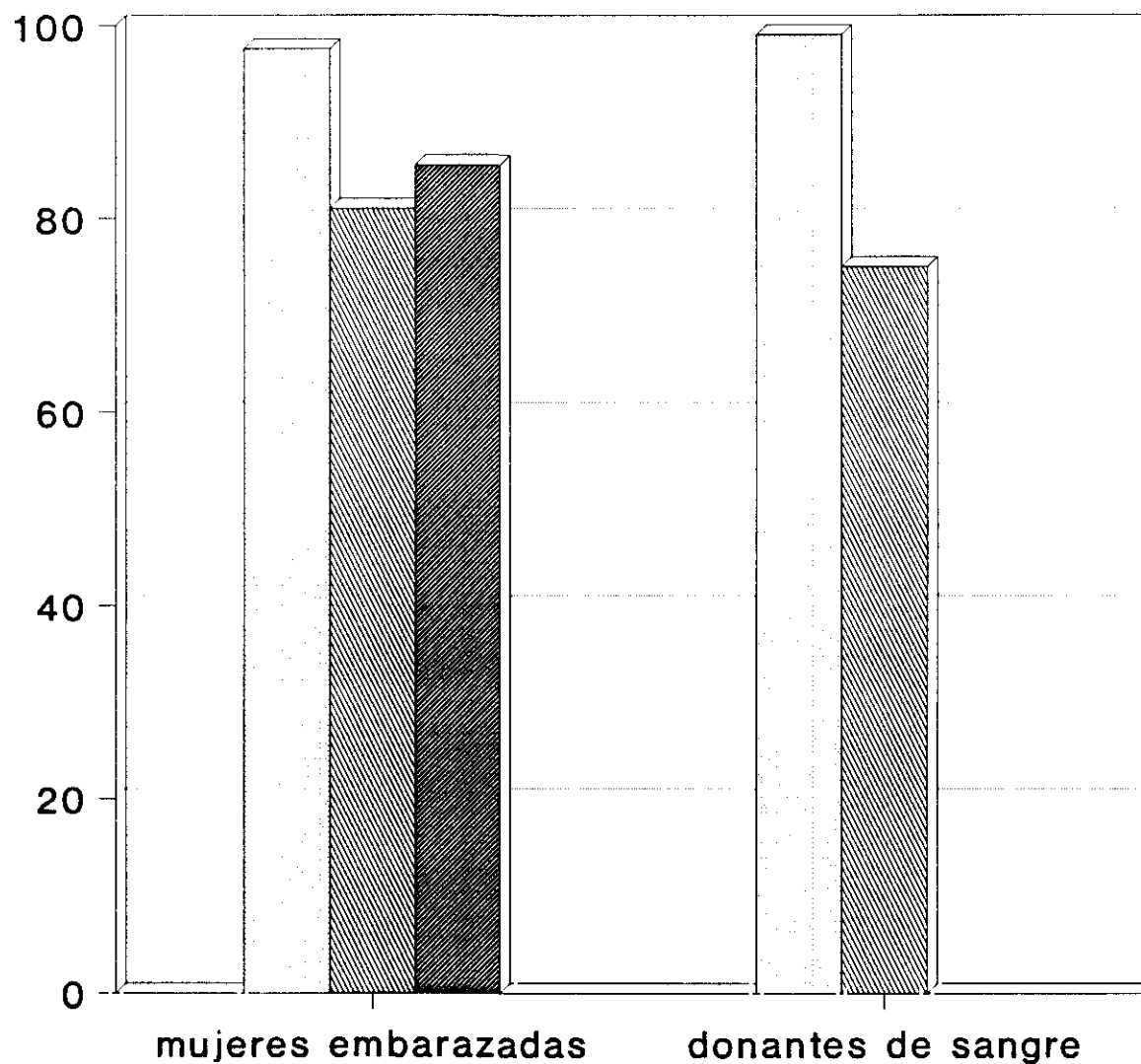


Figura IV.1. Porcentaje de resultados positivos al estudiar anticuerpos IgG frente a VCA-VEB, CMV y VHH-6.

IV.2. ANTICUERPOS FRENTE A VEB, CMV Y VHH-6 EN LOS DOS PRIMEROS AÑOS DE LA VIDA

Los resultados obtenidos al estudiar IgG frente a VEB, CMV y VHH-6 en los sueros de niños menores de 2 años se muestran en las **Tablas IV.2., IV.3. y IV.4.**, así como en las **Figuras IV.2., IV.3. y IV.4.** incluyéndose el número de muestras ensayadas en cada grupo de edad.

Cuando se estudia IgG frente a VCA-VEB por IFI en los sueros a dilución 1:8, existe un porcentaje de seropositividad en los niños menores de 2 meses de 83,3%, porcentaje que va decayendo progresivamente, hasta hacerse nulo a los 8 meses. A partir de los 9 meses de edad se empiezan a detectar anticuerpos IgG anti-VCA en los niños, siendo la seropositividad del 20,4% en el grupo entre 9 y 16 meses, y del 36,7% entre 16 y 24 meses (**Tabla IV.2., Figura IV.2.**).

Por otra parte, cuando se analizan los sueros a la dilución 1:128, se puede observar que el porcentaje de seropositividad decae desde un 33,3% en el grupo de 0-2 meses hasta un 2,4% en el de 4-8 meses, siendo estos porcentajes de seropositividad menores que los obtenidos a la dilución 1:8. Sin embargo, a partir de los 9 meses, los porcentajes de seropositividad a las diluciones 1:8 y 1:128 son muy similares (**Tabla IV.2.**) (16,7% en el grupo 9-16 meses, y 35% en el grupo 16-24 meses a 1:128, con

respecto al 20,4% y 36,7% a 1:8) .

Tabla IV.2.

Anticuerpos IgG anti-VCA-VEB en los dos primeros años de la vida (266 sueros)

| edad (meses) | nº de sueros probados | nº sueros (%) positivos a | |
|-----------------|-----------------------------|---------------------------|----------|
| | | 1:8 | 1:128 |
| 0 - 2 | 24 | 20 (83,3) | 8 (33,3) |
| 2 - 4 | 38 | 14 (36,8) | 2 (5,3) |
| 4 - 8 | 82 | 5 (6,1) | 2 (2,4) |
| 8 - 9 | 8 | 0 | |
| 9 - 15 | 54 | 11 (20,4) | 9 (16,7) |
| 15 - 24 | 60 | 22 (36,7) | 21 (35) |
| TOTAL | 266 | | |

Al estudiar IgG frente a CMV por ELISA, se observa que el porcentaje de seropositivos disminuye con la edad, de forma más lenta que en el caso anterior, hasta los 9 meses. A partir de los 10 meses se empiezan a observar individuos positivos, siendo los porcentajes de seropositividad en los grupos de 9 a 15 y de 15 a 24 meses del 27,7% y del 40%, respectivamente (Tabla IV.3., Figura IV.3.).

Tabla IV.3.

Anticuerpos IgG anti-CMV en los dos primeros años de la vida (266 sueros)

| edad (meses) | número de sueros | | % |
|-----------------|------------------|-----------|------|
| | probados | positivos | |
| 0 - 2 | 24 | 18 | 75 |
| 2 - 6 | 89 | 50 | 56,2 |
| 6 - 9 | 39 | 15 | 38,5 |
| 9 - 10 | 7 | 0 | 0 |
| 10 - 15 | 47 | 13 | 27,7 |
| 15 - 24 | 60 | 24 | 40 |
| TOTAL | 266 | | |

Por último, al estudiar los sueros por IFI frente a VHH-6, a partir de un porcentaje del 50% de positivos en el grupo de 0 a 3 meses, decae hasta el 4,5% entre 3 y 4 meses, y a partir de los 4 meses existen porcentajes de seropositivos superiores al 40%, llegando a ser del 62,8% en los niños entre 1 y 2 años (Tabla IV.4., Figura IV.4.).

Tabla IV.4.

Anticuerpos IgG anti-VHH-6 en los dos primeros años de la vida (263 sueros)

| edad (meses) | número de sueros | | % |
|-----------------|------------------|-----------|------|
| | probados | positivos | |
| 0 - 3 | 38 | 19 | 50 |
| 3 - 4 | 22 | 1 | 4,5 |
| 4 - 6 | 50 | 20 | 40 |
| 6 - 12 | 75 | 40 | 53,3 |
| 12 - 24 | 78 | 49 | 62,8 |
| TOTAL | 263 | | |

Al comparar el porcentaje de seropositividad frente a VEB en niños de 0 a 2 meses (**Figura IV.2.**) con el de mujeres embarazadas, se ha obtenido una diferencia significativa ($P=0,009$). Al hacerlo para CMV (**Figura IV.3.**), la diferencia no ha mostrado significación estadística ($P=0,3$). Por último, en lo que se refiere a VHH-6, al comparar el porcentaje de seropositivos entre 0 y 3 meses con el de mujeres embarazadas (**Figura IV.4.**), se ha encontrado diferencia significativa ($P=10^{-6}$).

Por otra parte, cuando se titulan las muestras de seguimiento de seis niños nacidos de madres IgG positivas a los tres virus, en las muestras tomadas en la primera semana de vida se obtienen títulos medios de anticuerpos de 1992, 240 y 73, siendo los títulos de las madres de 1852, 320, y 117, frente a CMV, VEB, y VHH-6, respectivamente, no existiendo diferencias significativas. Por último, al estudiar los títulos de las muestras de seguimiento de los citados seis niños mediante un análisis de regresión lineal simple (**Figura IV.5.**), se observa que la duración media de los títulos medios de anticuerpos IgG frente a VEB, CMV y VHH-6 era de 157, 150 y 87 días, respectivamente. De los seis niños estudiados, uno mostró seroconversión frente a VHH-6 a los 6 meses de edad, después de haber perdido los anticuerpos adquiridos de la madre.

**Figura IV.2. Anticuerpos IgG anti-VCA-VEB en niños
menores de 2 años**

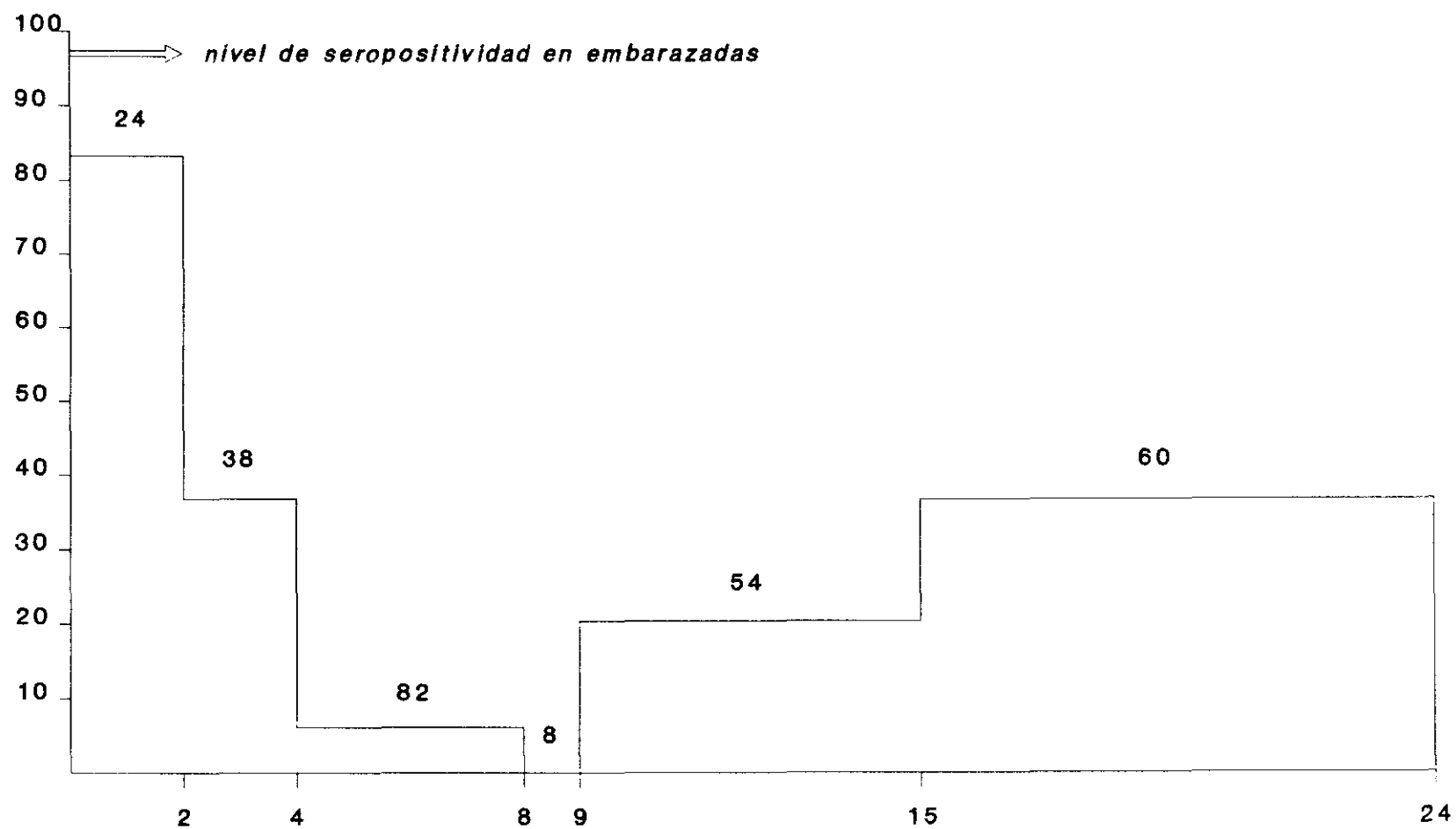


Figura IV.3. Anticuerpos IgG anti-CMV en niños
menores de 2 años

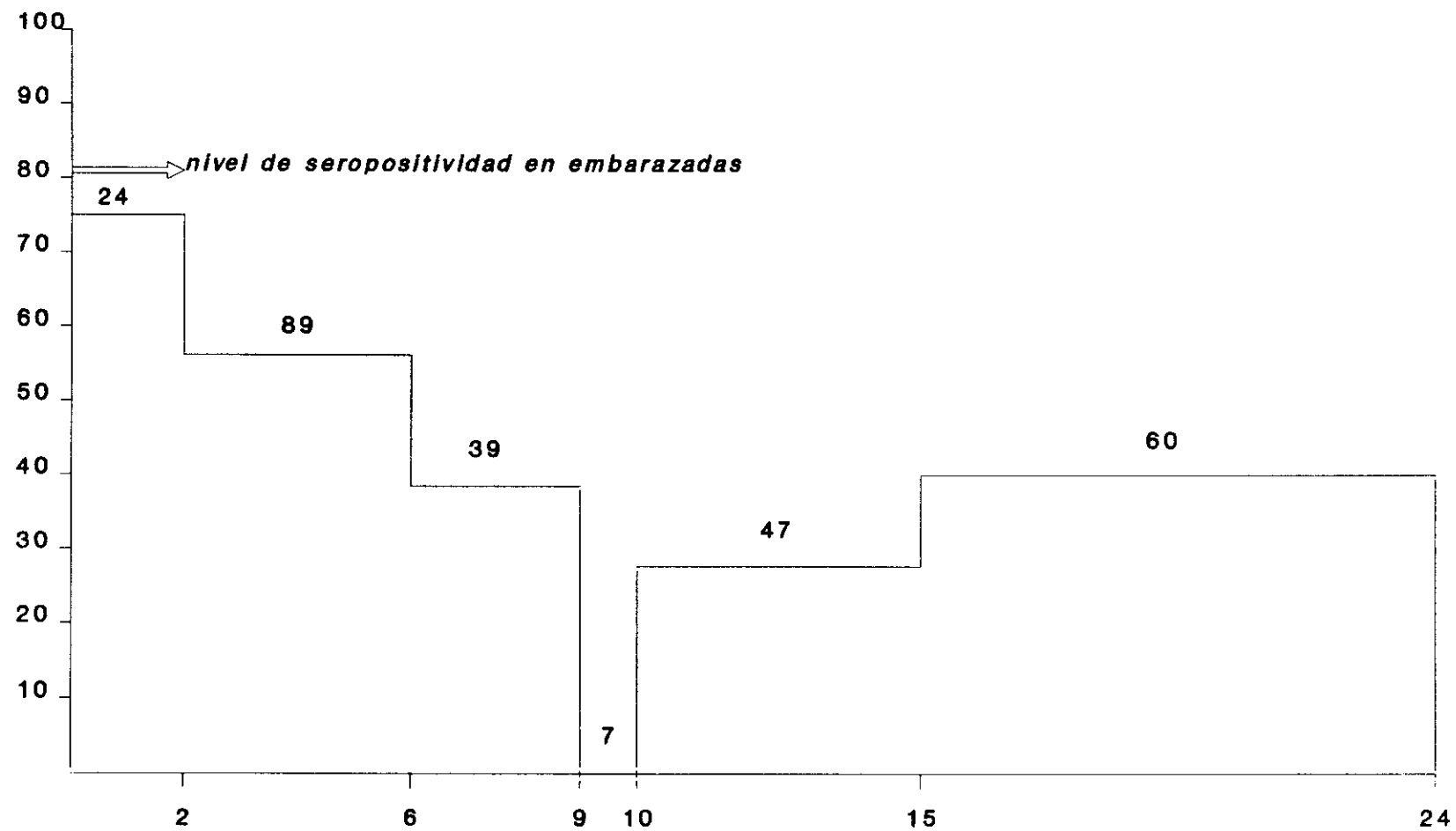
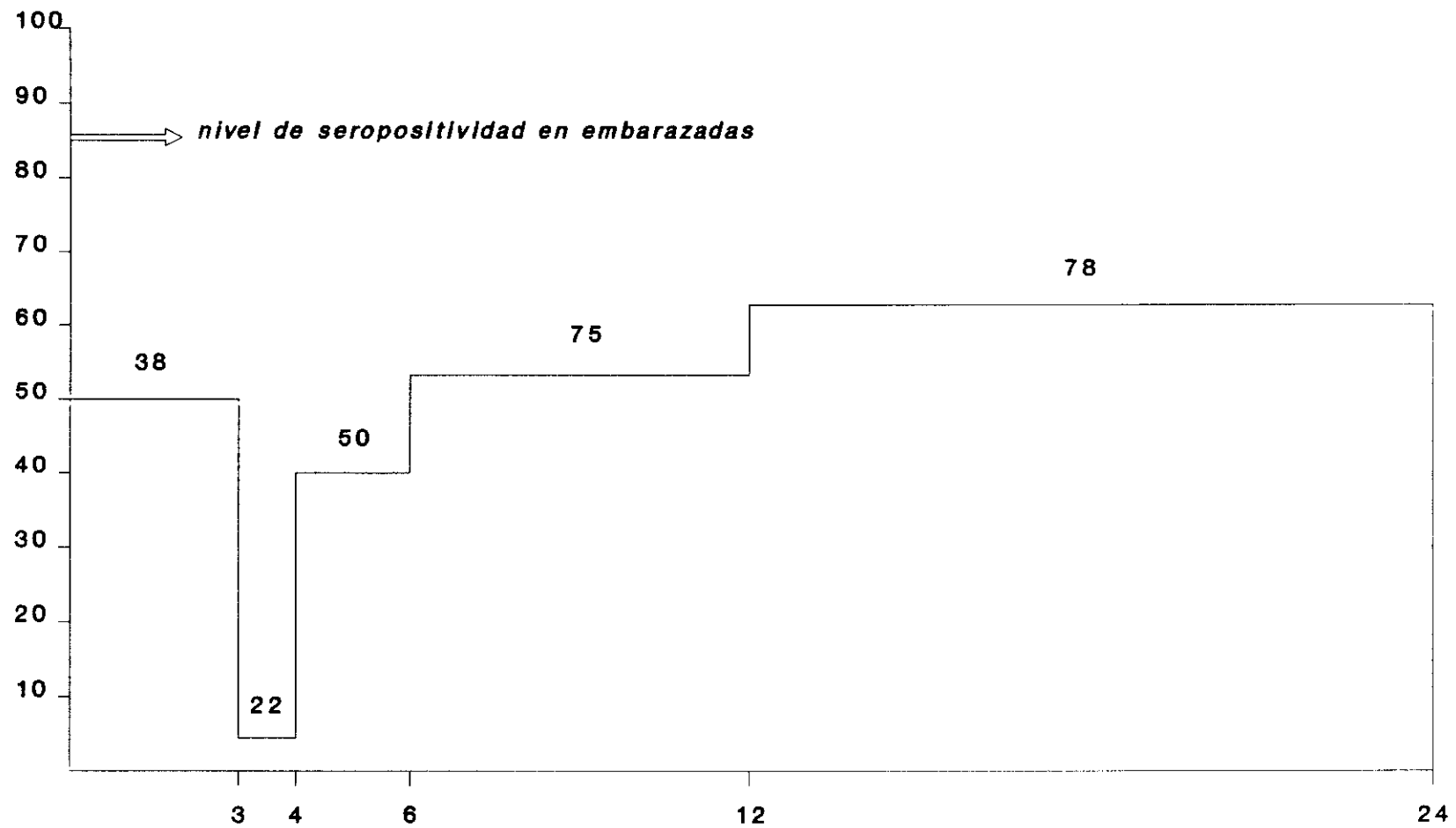


Figura IV.4. Anticuerpos IgG anti-VHH-6 en niños
menores de 2 años



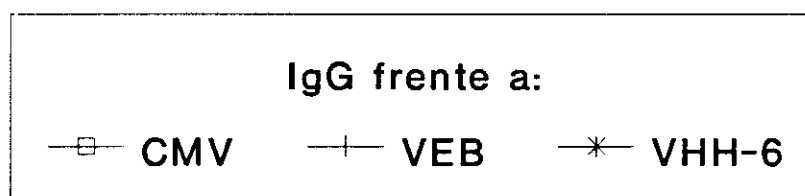
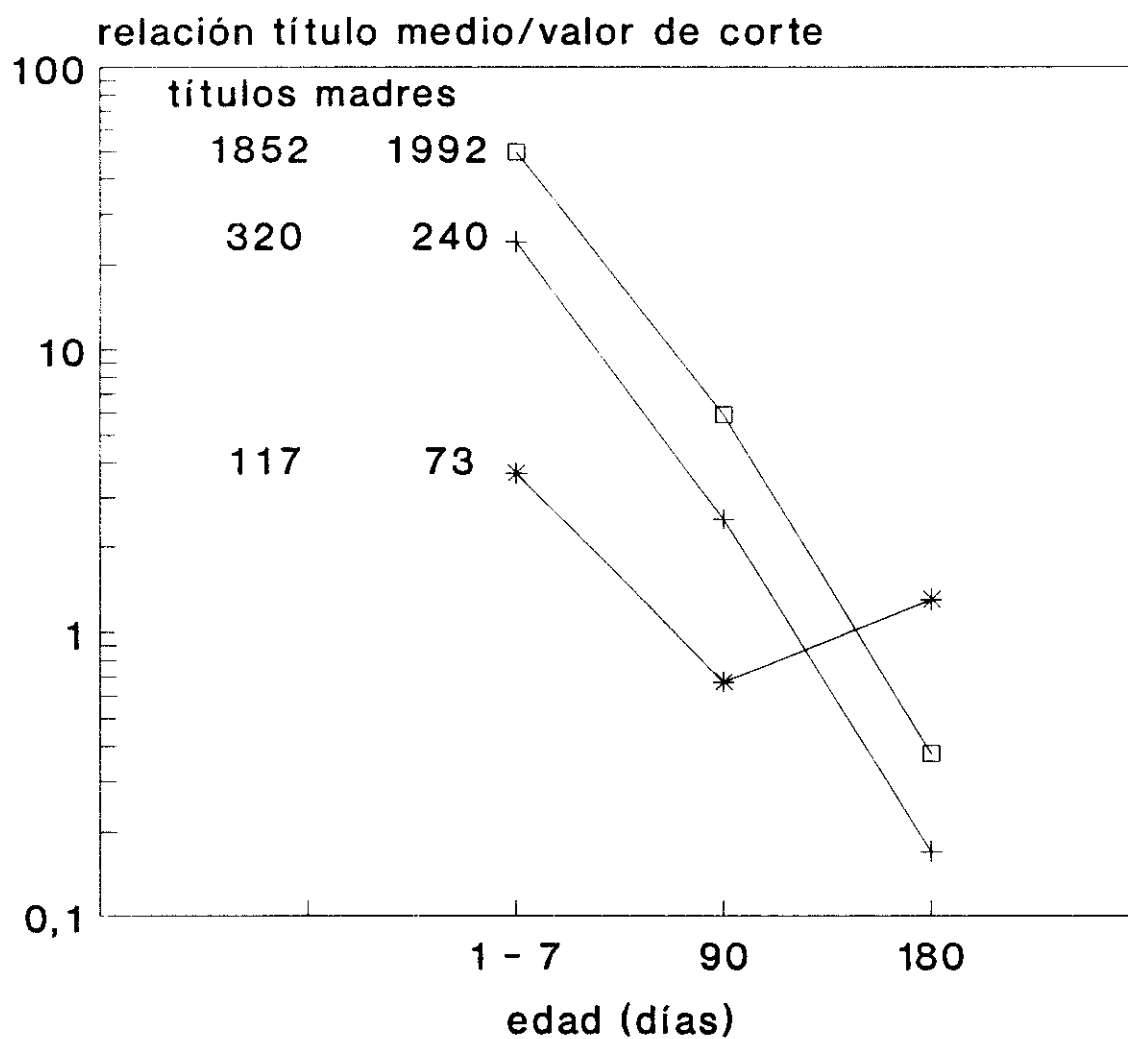


Figura IV.5. Títulos medios de IgG frente a VEB, CMV y VHH-6 en muestras de seguimiento de 6 niños recién nacidos

IV.3. PARTICIPACION DE VEB, CMV Y VHH-6 EN SINDROMES MONONUCLEOSICOS EN POBLACION PEDIATRICA

Para la clasificación de casos, se han estudiado sistemáticamente los siguientes marcadores serológicos de infección por VEB y CMV: IgM frente a VCA-VEB y CMV; IgG frente a VCA-VEB, y anticuerpos anti-EBNA. En los casos en que no se ha obtenido resultado indicativo de infección reciente frente a ninguno de los virus se ha determinado la presencia de IgM frente a VHH-6. En todos los casos se ha estudiado, además la presencia de IgM anti-rubéola, resultando todos ellos negativos.

IV.3.1. Clasificación de los casos en relación con el VEB

Los casos se han clasificado como producidos por el VEB si presentan al menos uno de los siguientes perfiles de anticuerpos específicos de infección por el virus:

1. Presencia de IgM anti-VCA, y/o
2. Presencia de IgG anti-VCA en ausencia de anticuepos anti-EBNA.

Utilizando como criterio la presencia de IgM anti-VCA se ha obtenido resultado indicativo de infección reciente en 94 casos (59,1% sobre el total de casos). Cuando se considera la presencia de IgG anti-VCA en ausencia de anticuerpos anti-EBNA se obtiene evidencia de infección

reciente en 92 casos (57,9%). 85 casos (53,5%) han mostrado ambos marcadores de infección reciente y, por último, 101 casos (63,5% del total) han mostrado al menos uno de los dos marcadores de infección reciente, siendo así considerados como casos producidos por el VEB.

Así pues, entre los casos clasificados como producidos por el VEB se ha detectado IgM anti-VCA en el 93,1%, y la presencia de IgG anti-VCA en ausencia de anticuerpos anti-EBNA en el 91,1%, y ambos en el 84,2%. En la **Figura IV.6.** se representan los resultados obtenidos con estos dos marcadores de infección por el VEB en los distintos grupos de edad. En el grupo de niños de 1 y 2 años de edad se obtiene ausencia de anticuerpos anti-EBNA en presencia de IgG anti-VCA en 26 casos de los 27 estudiados (96,3%), en contraste con los 23 casos que mostraron resultado positivo al estudiar IgM anti-VCA (85,2%). En el grupo de 5 a 8 años el rendimiento de ambos marcadores ha sido idéntico (17 positivos de 18 estudiados, 94,4%). En los otros dos grupos de edad, en cambio, el rendimiento de la detección de IgM ha sido superior (97,1% sobre 94,1% en el grupo de 3 y 4 años, y 95,5% sobre 77,3% en el de 9 a 14 años). En ningún grupo de edad la diferencia en el rendimiento de estos dos marcadores fue significativa.

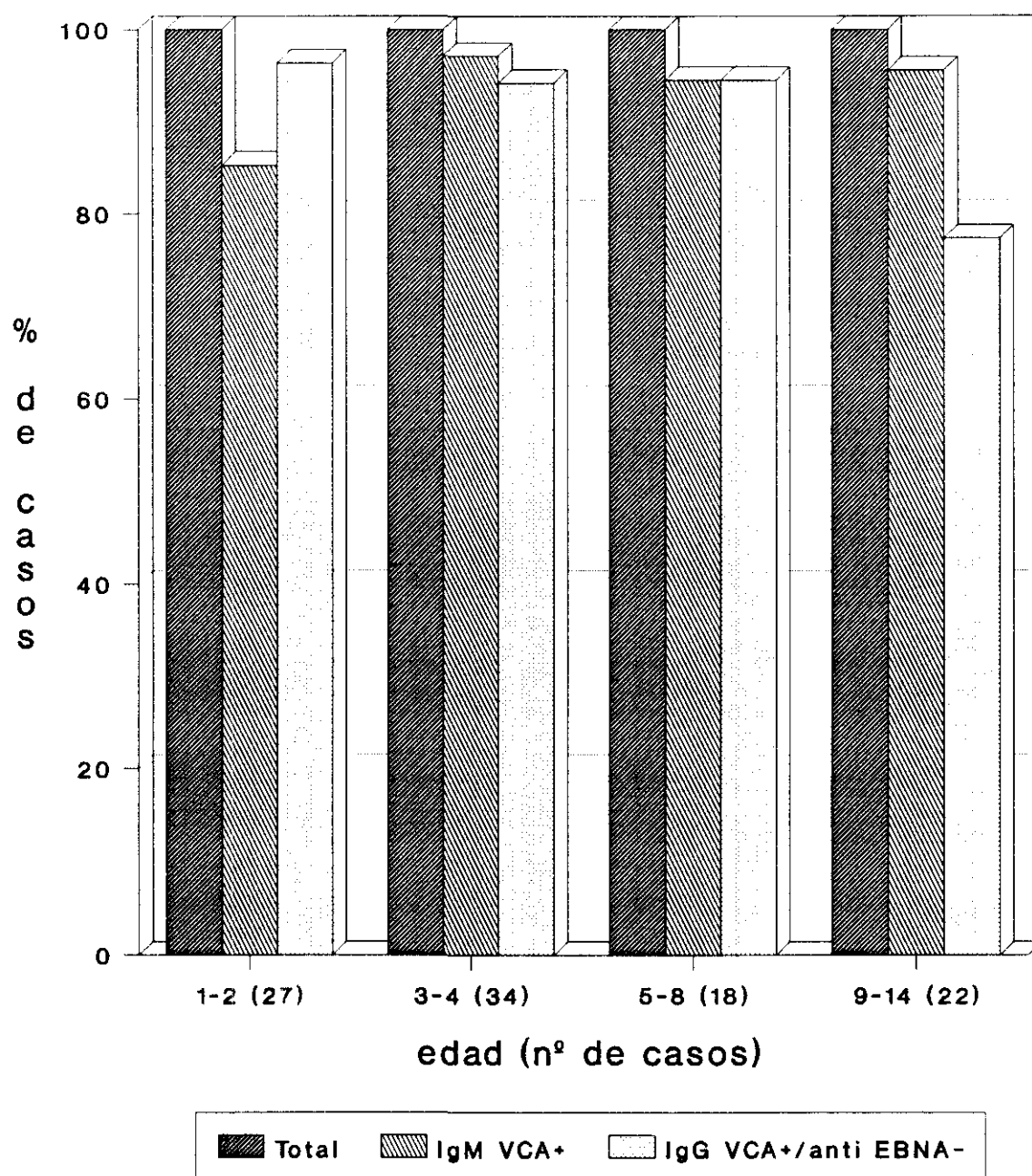


Figura IV.6. Detección de IgM anti-VCA, y de IgG anti-VCA en ausencia de anticuerpos anti-EBNA, por grupo de edad

En la **Figura IV.7.** se muestra el rendimiento de ambos marcadores en función del tiempo de evolución de la enfermedad. En las muestras tomadas en los cinco primeros días es más eficaz el procedimiento que valora la presencia de IgG anti-VCA en ausencia de anticuerpos anti-EBNA (92,5%) que la detección de IgM anti-VCA (88,7%), en tanto que en aquéllas tomadas después del sexto día es más eficaz este segundo marcador, no siendo la diferencia en el rendimiento de ambos marcadores significativa.

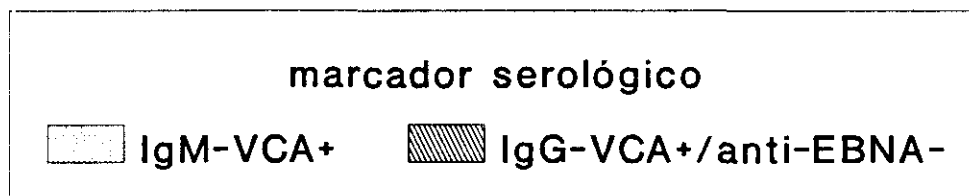
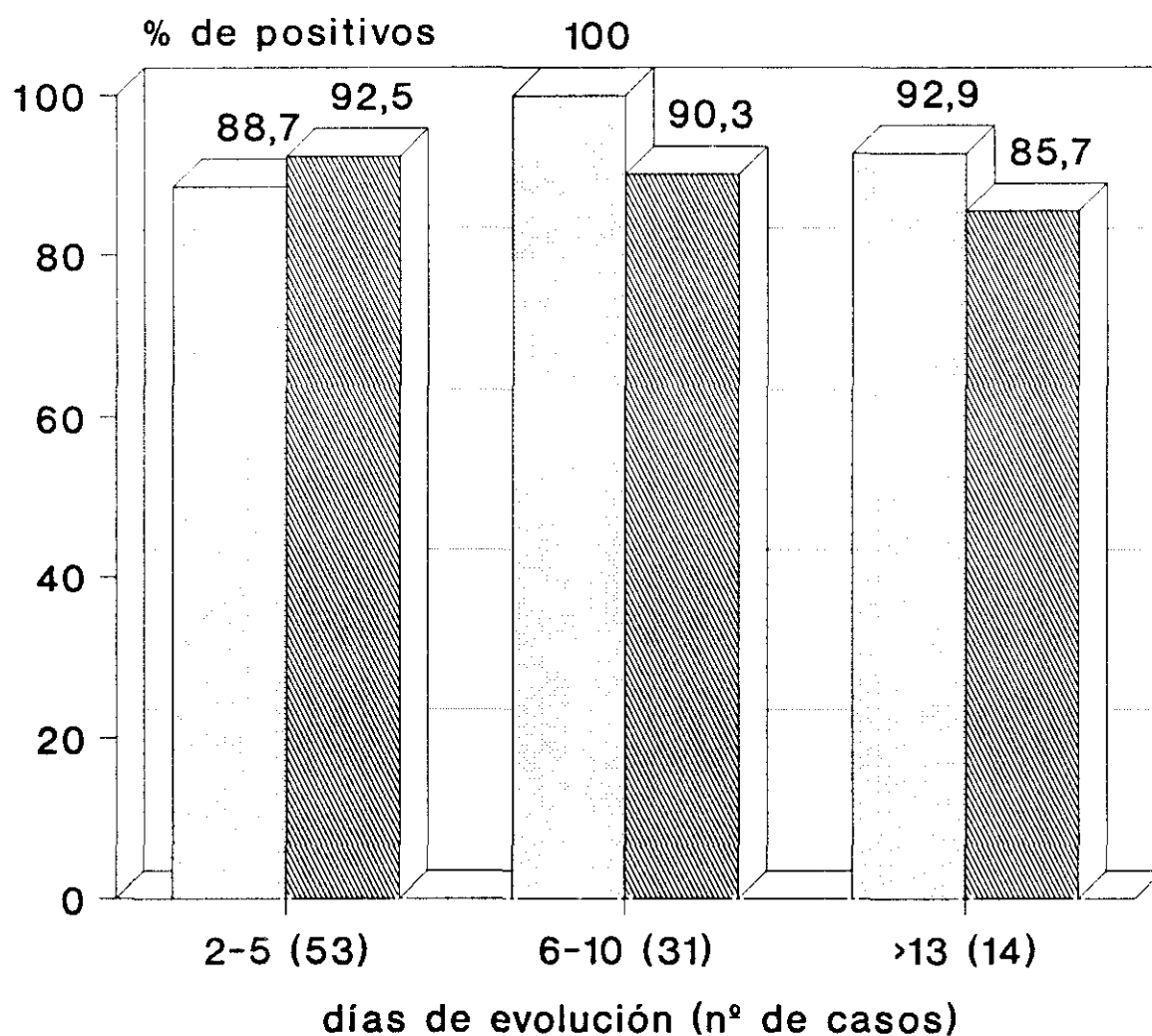


Figura IV.7. Eficacia de los marcadores IgM-VCA, e IgG-VCA en ausencia de anti-EBNA, en función del tiempo de evolución

En los casos en que no se ha detectado infección reciente por el VEB, los otros dos perfiles posibles utilizando el criterio combinado IgG anti-VCA/anticuerpos anti-EBNA ha permitido clasificar los casos como:

- infección pasada, si presentaban presencia de anticuerpos a los dos antígenos: 28 casos (17,6% del total de casos).

- no infectados por el VEB, si mostraban ausencia de anticuerpos a ambos antígenos: 30 casos (18,9% del total de casos).

En la **Tabla IV.5.** y en la **Figura IV.8.** se muestra la clasificación de los casos estudiados en relación con el virus Epstein-Barr, en función del grupo de edad. Se han obtenido perfiles indicativos de susceptibilidad al VEB frecuentemente en los primeros años, decreciendo progresivamente desde el 53,3% al año de vida hasta el 8,3% entre 5 y 7 años. Por encima de esta edad, todos los casos mostraban marcadores bien de infección reciente o de infección pasada. Por otra parte, el porcentaje de casos con marcadores de infección reciente va aumentando desde el 40% al año de vida, hasta alcanzar el 100% en el grupo de 12 a 14 años.

Tabla IV.5.

Clasificación de los casos estudiados en relación con el virus Epstein-Barr, en función del grupo de edad.

| edad (años) | número de casos | infección por VEB | | |
|----------------|-----------------------|-------------------|---------------------|-----------------------|
| | | no ¹ | pasada ² | reciente ³ |
| 1 | 15 | 8 (53,3) | 1 (6,7) | 6 (40) |
| 2 | 41 | 13 (31,7) | 7 (17,1) | 21 (51,2) |
| 3 | 28 | 5 (17,9) | 3 (10,7) | 20 (71,4) |
| 4 | 21 | 2 (9,5) | 5 (23,8) | 14 (66,7) |
| 5 a 7 | 24 | 2 (8,3) | 7 (29,2) | 15 (62,5) |
| 8 a 11 | 20 | 0 (0) | 5 (25) | 15 (75) |
| 12 a 14 | 10 | 0 (0) | 0 (0) | 10 (100) |
| TOTAL | 159 | 30 (18,9) | 28 (17,6) | 101 (63,5) |

¹No infectados: negativos a IgM e IgG anti-VCA y anti-EBNA.

²Infección pasada: positivos a IgG anti-VCA y anti-EBNA, y negativos a IgM anti-VCA.

³Infección reciente: positivos a IgM anti-VCA y/o positivos a IgG anti-VCA y negativos a anti-EBNA.

Por otra parte, en la **Tabla IV.6.** y en la **Figura IV.9.** se muestran los casos producidos por el VEB, así como los negativos, en función del tiempo de evolución de la enfermedad.

Tabla IV.6.

Casos de MI producidos por el VEB con respecto del total, según el tiempo de evolución

| Tiempo de evolución (días) | número de casos | Número de casos (%) | |
|----------------------------|-----------------|---------------------|------------------|
| | | positivos | negativos |
| 1 y 2 | 26 | 18 (69,2) | 8 (30,8) |
| 3 y 4 | 37 | 26 (70,3) | 11 (29,7) |
| 5 y 6 | 24 | 14 (58,3) | 10 (41,7) |
| 7 y 8 | 19 | 16 (84,2) | 3 (15,8) |
| 9 y 10 | 15 | 10 (66,7) | 5 (33,3) |
| > 11 | 27 | 14 (51,9) | 13 (48,1) |
| TOTAL | 148 | 98 (66,2) | 50 (33,8) |

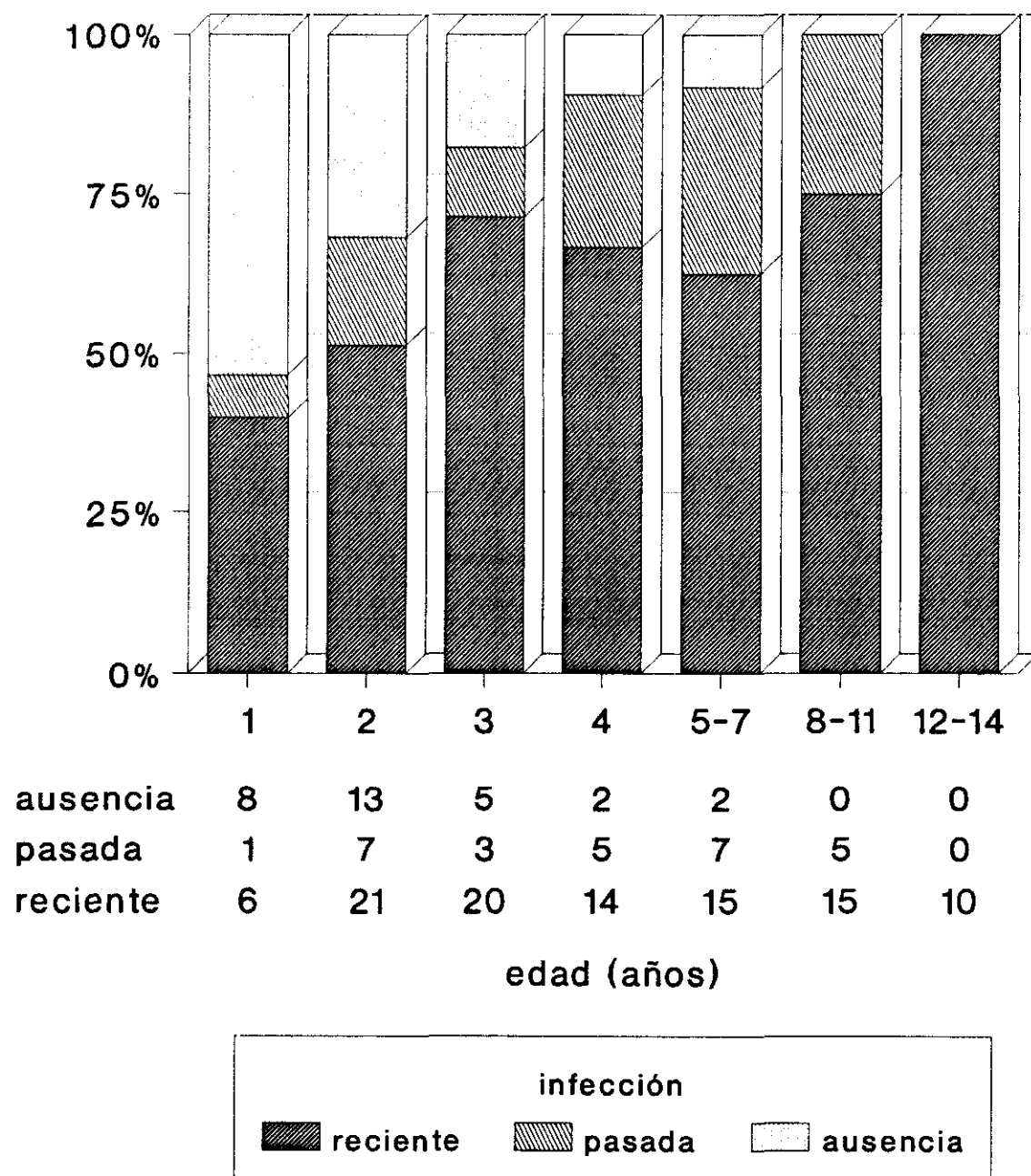


Figura IV.8. Total de casos de MI agrupados como infección reciente, pasada, o sin infección previa por VEB

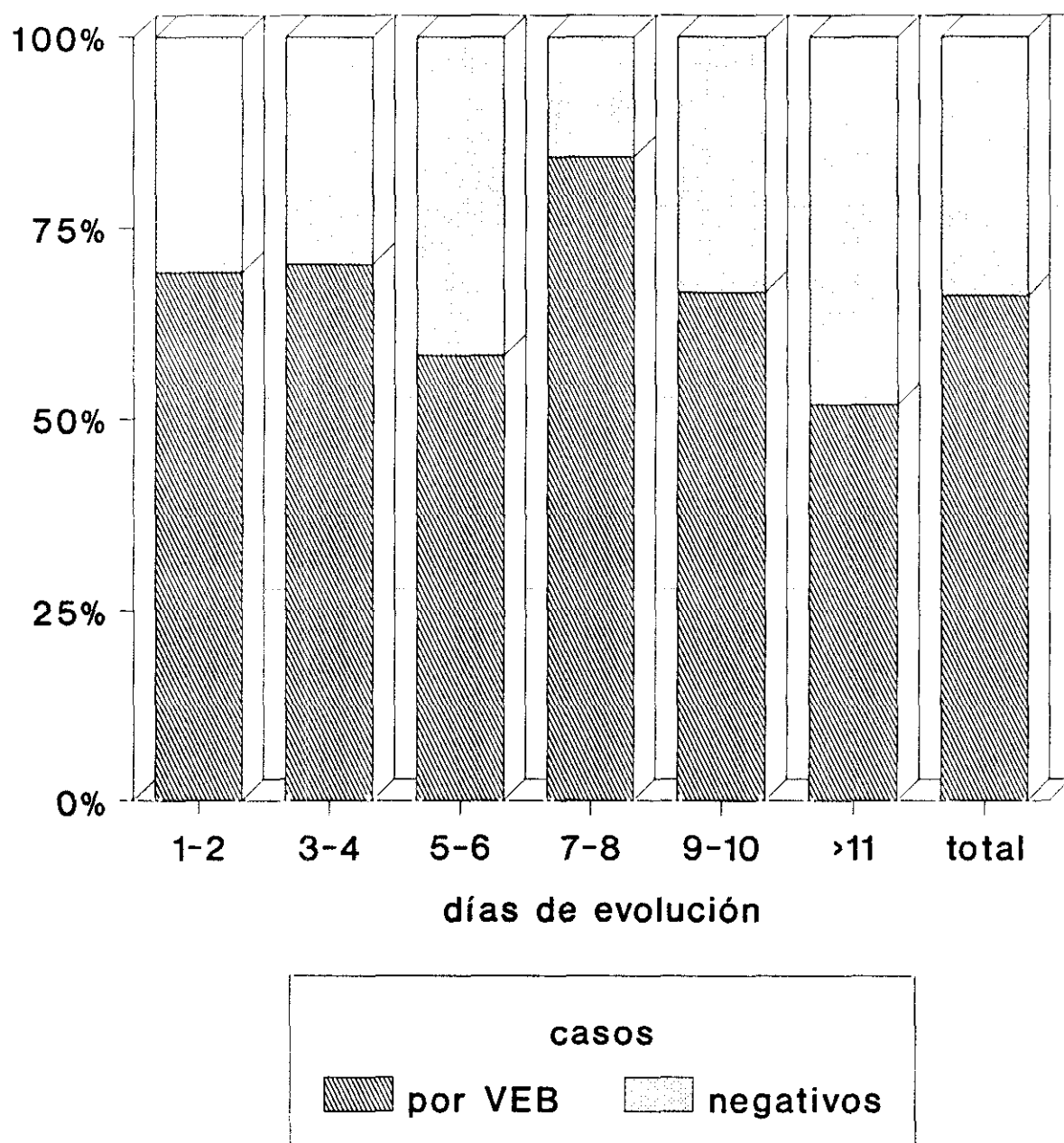


Figura IV.9. Casos de MI producidos por VEB con respecto al total, según el tiempo de evolución

IV.3.2. Casos por CMV

Al estudiar la presencia de IgM específica anti-CMV por ELISA de captura anti- μ en los 159 casos estudiados, se ha encontrado resultado positivo en 35. Cuatro de ellos, que eran negativos a VEB, fueron considerados como producidos por CMV. Dos casos que inicialmente fueron caracterizados como infección reciente por VEB fueron finalmente considerados como infección doble por VEB y CMV, teniendo en cuenta que mostraban IgG anti-CMV de baja avidéz. Así pues, 6 casos (3,8% del total) sufrieron infección primaria por CMV.

Los casos por CMV se produjeron en dos niños de 2 años; en un niño de 3 años, y en un niño de seis años; los casos con primoinfección doble se produjeron en un niño de 2 años y en otro de 4 años.

En tres de los cuatro casos con infección por CMV, así como en ambos con infección doble, se puso en evidencia la presencia de IgG anti-CMV de baja avidéz. El restante caso no se pudo ensayar, por no estar disponible.

Los resultados obtenidos en los 29 casos restantes que mostraban IgM anti-CMV, siendo causados por el VEB se presentan en el apartado IV.9. INCIDENCIA DE REACCIONES HETEROLOGAS ENTRE VEB, CMV, Y VHH-6 EN MONONUCLEOSIS INFECCIOSA.

IV.3.3. Casos por VHH-6

Se ha estudiado IgM frente a VHH-6 en 53 de los 54 clasificados como negativos a VEB y a CMV, resultando positivos cinco casos (9,4% de los casos estudiados, 3,2% del total). Los casos positivos se acumulan en niños de un año (3 casos de 9 estudiados, 33,3%), un caso en un niño de 2 años, de 18 estudiados (5,6%) y otro en un niño de 4 años, de 7 estudiados (14,3%). Los cinco casos mostraron IgG anti-VHH-6 de baja avidéz, confirmando la infección primaria por el virus.

En la **Tabla IV.7.** y en la **Figura IV.10.** se muestran los casos positivos a los tres virus, agrupados según la edad.

Tabla IV.7.

Casos producidos por VEB, CMV y VHH-6, clasificados por grupo de edad

| edad | nº | nº (%) de casos positivos a: | | | | negativos |
|-------|-----|------------------------------|---------|---------|----------|-----------|
| | | VEB | CMV | VEB+CMV | VHH-6 | |
| 1 | 15 | 6 (40) | | | 3 (20) | 6 (40) |
| 2 | 41 | 20 (48,8) | 2 (4,9) | 1 (2,4) | 1 (2,4) | 17 (41,5) |
| 3 | 28 | 20 (71,4) | 1 (3,6) | | | 7 (25) |
| 4 | 21 | 13 (61,9) | | 1 (4,7) | 1 (4,7) | 6 (28,6) |
| 5-7 | 24 | 15 (62,5) | 1 (4,2) | | | 8 (33,3) |
| 8-11 | 20 | 15 (75) | | | | 5 (25) |
| 12-14 | 10 | 10 (100) | | | | |
| | 159 | 99 (62,3) | 4 (2,5) | 2 (1,3) | 5 (3,2)* | 49 (30,8) |

*Porcentaje calculado sobre 158 casos.

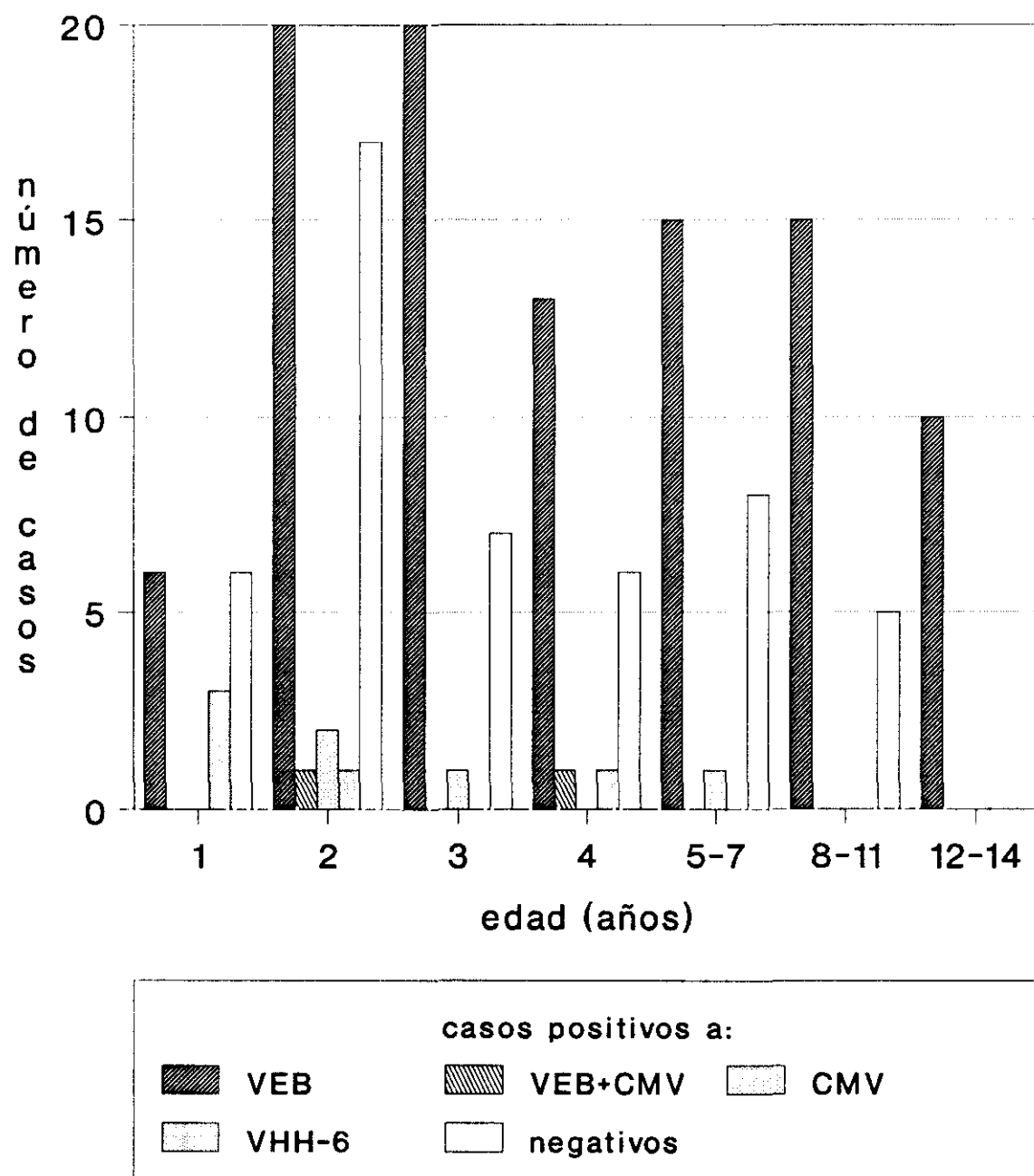


Figura IV.10. Casos de MI producidos por VEB, CMV y VHH-6 por grupo de edad

IV.4. VALORACION DE LA CUANTIFICACION DE IgG ANTI-VCA COMO MARCADOR DE LA INFECCION RECIENTE POR EL VEB

Se ha hecho una valoración cuantitativa de IgG anti-VCA sobre 121 casos de los 129 que mostraban bien marcadores indicativos de infección reciente (94 casos) o de infección pasada (27 casos). En la **Figura IV.11.** se muestran los títulos medios obtenidos en los distintos grupos de edad.

En los casos de infección reciente los títulos medios han sido 1:631, 1:550, 1:535 y 1:733 en los grupos de 1 y 2 años, 3 y 4 años, 5 y 6, y 7 a 14 años, respectivamente. Por otra parte, en los casos con marcadores serológicos de infección pasada los títulos medios han sido 1:592, 1:418, 1:608 y 1:323. Considerando como significativas las diferencias en 4 o más veces, como es una práctica habitual en estudios serológicos, no se observan diferencias significativas en los títulos obtenidos en los casos de infección reciente o previa, en ninguno de los grupos de edad. Tampoco existen diferencias en los distintos grupos de edad de los casos caracterizados como infección reciente o infección previa.

Por otra parte, los títulos medios de los casos con menos de una semana de evolución son prácticamente iguales a los de aquéllos con más de siete días (**Figura IV.12.**).

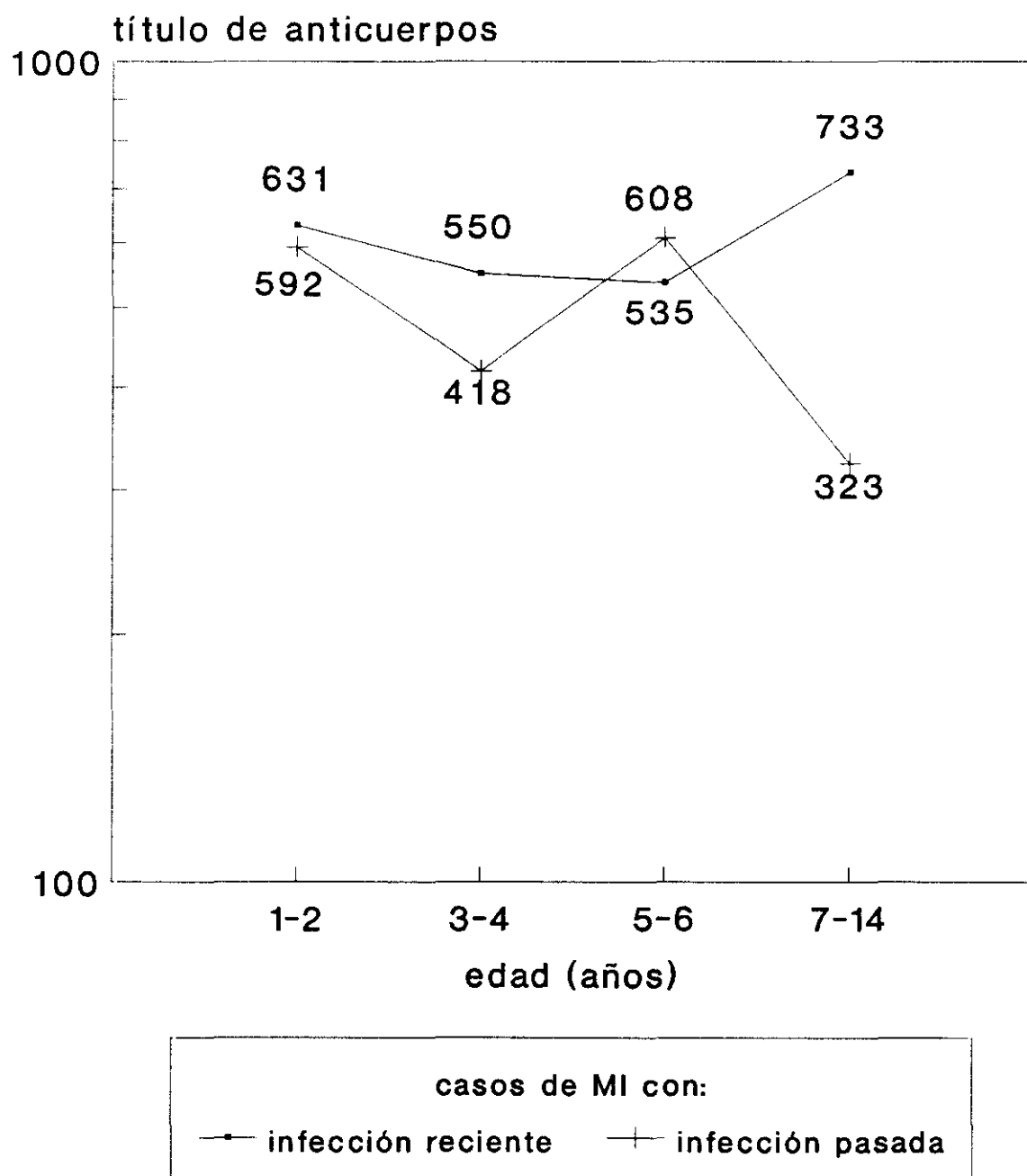


Figura IV.11. Títulos medios de IgG frente a VCA por grupo de edad, según sea infección reciente o pasada por VEB

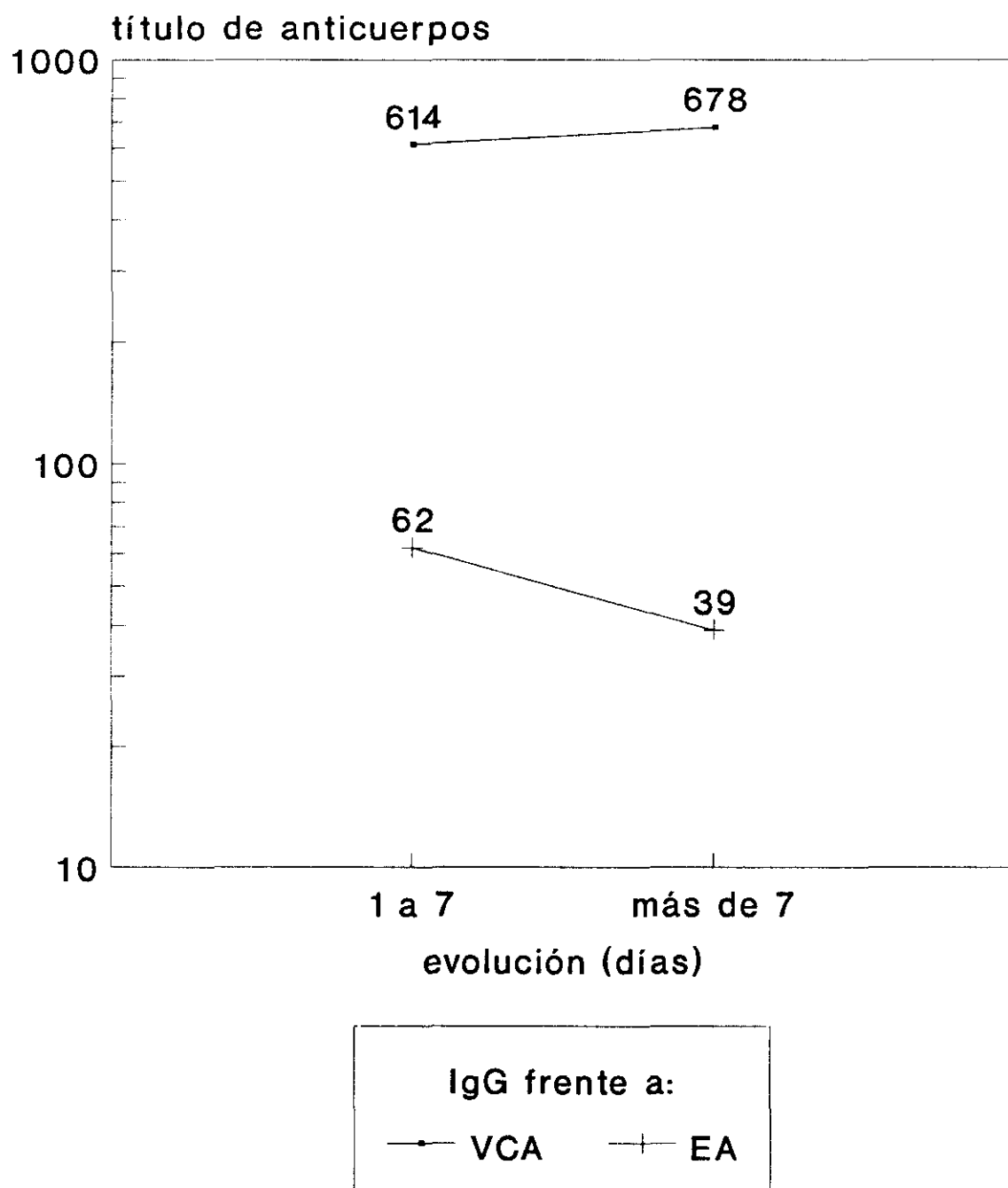


Figura IV.12. Títulos medios de IgG anti-VCA y anti-EA en los casos de MI por VEB, según el tiempo de evolución

IV.5. APLICACION DE LA PRESENCIA DE IgG FRENTE AL ANTIGENO TEMPRANO DEL VEB COMO MARCADOR DIAGNOSTICO DE LA INFECCION RECIENTE POR EL VEB

En lo que se refiere a la aplicación de la detección de anticuerpos IgG frente al antígeno temprano se ha obtenido resultado positivo en 93 casos de los 101 caracterizados como producidos por el VEB (92,1%). Los casos positivos han mostrado títulos de 1:10 (75 casos), 1:40 (12), y mayores o iguales a 1:640 (6), siendo el título medio entre los positivos de 1:55.

Por otra parte, entre los casos caracterizados como no infectados por el VEB no se ha encontrado ninguno positivo. En los 28 niños con infecciones pasadas se ha obtenido resultado positivo en 27 (96,4%), con títulos de 1:10 (12 casos), 1:40 (4), 1:160 (3), y mayores o iguales a 1:640 (8). El título medio ha sido 1:218.

En la **Figura IV.13.** se muestran los títulos medios obtenidos al estudiar IgG anti-EA en los distintos grupos de edad. Considerando significativa una diferencia de 4 o más veces en los títulos de anticuerpos, se observan títulos medios significativamente más altos en los casos clasificados como infección pasada en los grupos de 1 y 2 años (relación 5,6), y 5 y 6 años (relación 11,3). En los grupos de 3 y 4 años y de 7 a 14 años los cocientes han sido, respectivamente 3,8 y 2,2.

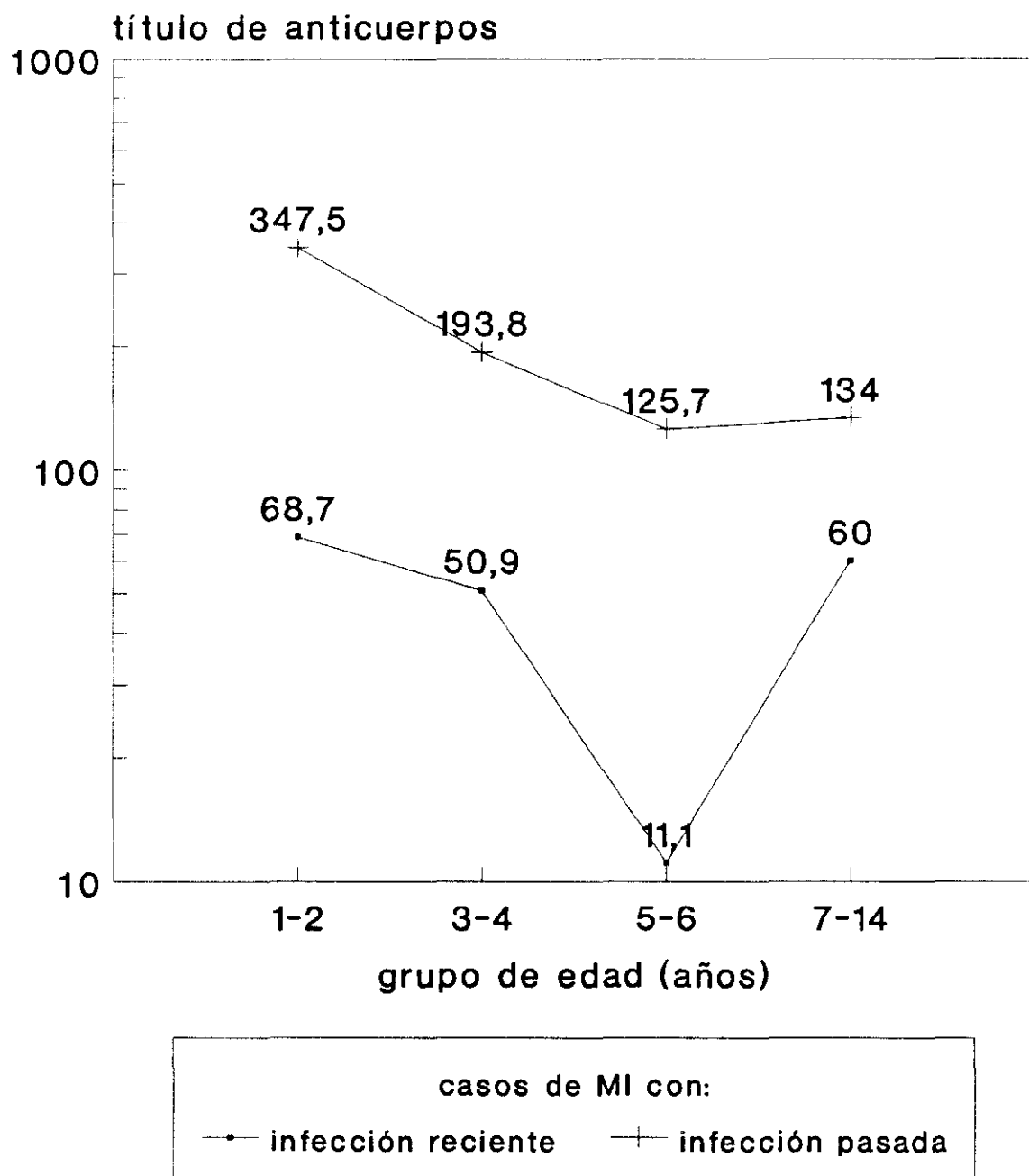


Figura IV.13. Títulos medios de IgG anti-EA, por grupo de edad, en infección reciente y pasada por VEB

Finalmente, los títulos medios de los casos con menos de una semana de evolución han sido 1:62, en tanto que los de aquéllos con más de siete días han sido 1:39, no siendo, de cualquier forma la diferencia serológicamente significativa (Figura IV.12.).

Así pues, la detección de IgG frente al antígeno temprano en su aplicación al diagnóstico de infección por VEB ha mostrado unos valores de sensibilidad del 92,1% y de especificidad del 51,7%, siendo el valor predictivo positivo el 76,9%, y el negativo el 78,9% (Tabla IV.8.)

Tabla IV.8.

Características de la detección de anticuerpos IgG frente al antígeno temprano en el diagnóstico de la MI

| | | Casos por VEB | |
|--------|---|---------------|----|
| | | + | - |
| IgG-EA | + | 93 | 28 |
| | - | 8 | 30 |

sensibilidad: $93 / 101 \times 100 = 92,1\%$

especificidad: $30 / 58 \times 100 = 51,7\%$

valor predictivo positivo: $93 / 121 \times 100 = 76,9\%$

valor predictivo negativo: $30 / 38 \times 100 = 78,9\%$

En la **Figura IV.14.** se representan los porcentajes de resultados positivos de IgG anti-EA en los pacientes estudiados, agrupados según la edad, y según se trate de casos producidos por el VEB, y de infecciones pasadas. No hay diferencias significativas en ningún grupo de edad en los niveles de IgG frente a EA, en casos de infección reciente o pasada, aunque los casos con infección pasada tienen menos frecuentemente IgG anti-EA cuando se producen en los niños mayores de siete años.

En la **Figura IV.15.** se muestran los porcentajes de resultados positivos al estudiar IgG anti-EA, en función del tiempo de evolución. La máxima eficacia se obtiene cuando las muestras estudiadas tienen más de 13 días de evolución, aunque no existe significación en las diferencias.

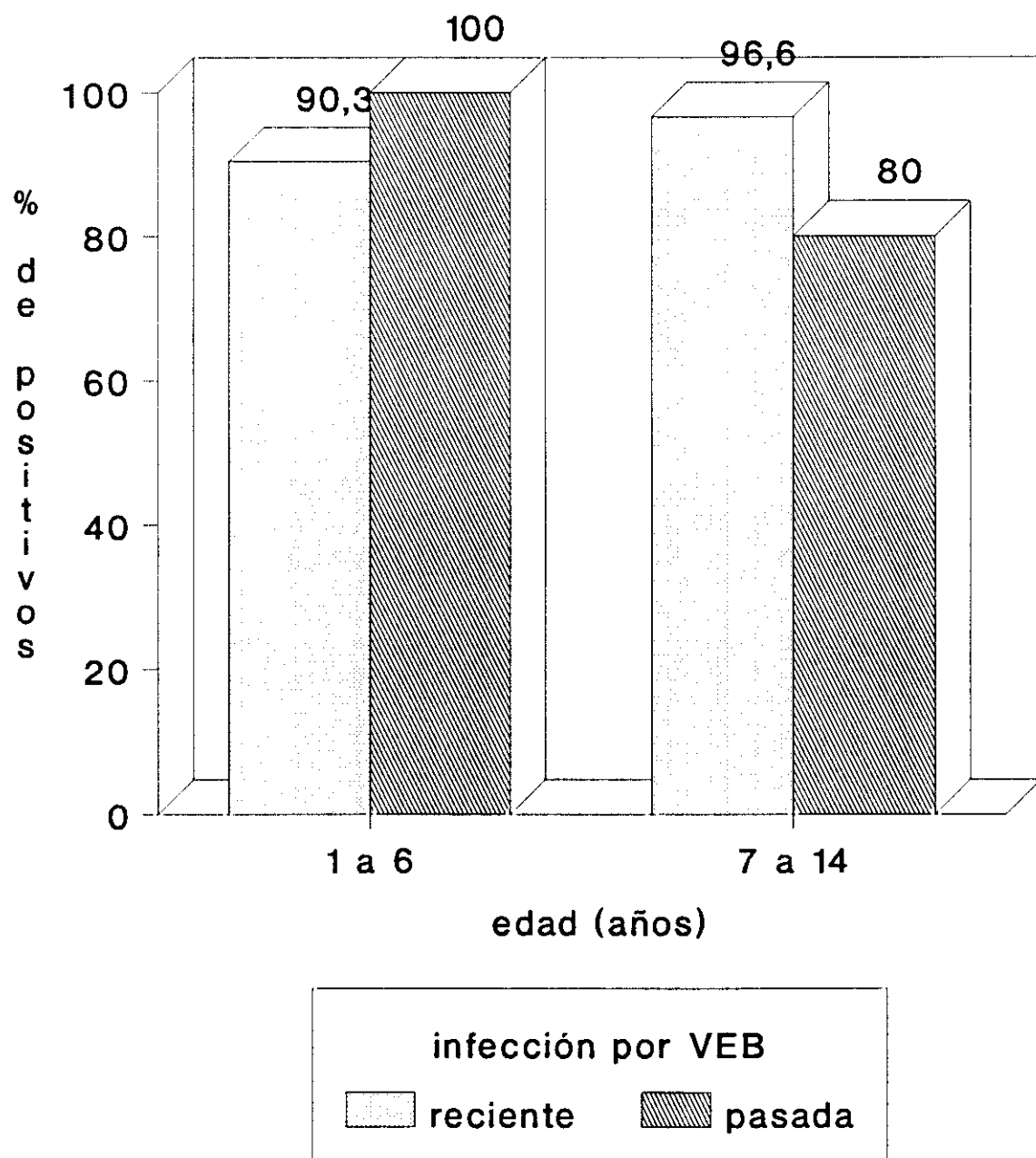


Figura IV.14. Casos de MI con IgG anti-EA, según sean infección reciente o pasada por VEB, por grupo de edad

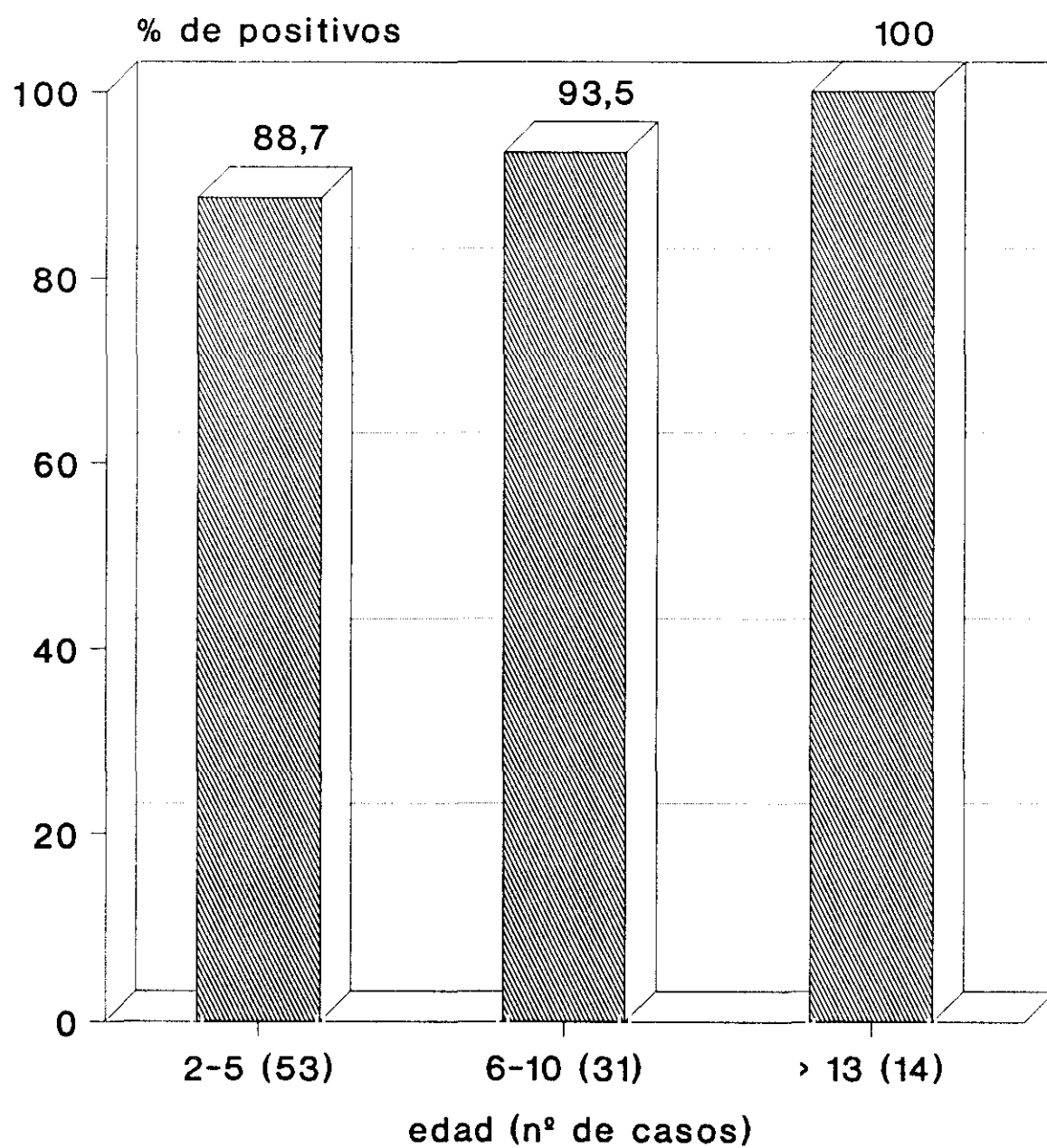


Figura IV.15. Eficacia de la detección de IgG anti-EA, según los días de evolución de la enfermedad

IV.6. APLICACION DE ESTUDIOS DE AVIDEZ DE IgG AL DIAGNOSTICO DE MI POR VEB

Se ha determinado la presencia de IgG anti-VCA de baja avidez en 121 de los 129 casos con marcadores indicativos de infección reciente (94 casos) o infección pasada (27 casos).

En la **Tabla IV.9.** se muestran los resultados obtenidos con el ensayo de avidez de IgG anti-VCA. Globalmente, 89 de los 94 sueros (94,7%) que mostraban marcadores serológicos indicativos de infección reciente por el VEB mostraron un título de anticuerpos IgG anti-VCA de baja avidez igual o superior a 1:4. Los títulos fueron 1:4 (35 casos), 1:16 (34 casos), e iguales o mayores a 1:64 (20 casos). No se observan diferencias en el rendimiento del ensayo de avidez en los tres grupos con diferentes perfiles serológicos. Los títulos medios obtenidos tampoco han mostrado diferencias en los diferentes perfiles de anticuerpos: los casos con presencia de IgM e IgG anti-VCA en ausencia de anti-EBNA presentaron un título medio de 1:22; los que mostraban presencia de los tres marcadores, de 1:17, y, por fin, los que presentaban sólo presencia de IgG anti-VCA un título medio de 1:20. Tampoco se han obtenido diferencias en los títulos de IgG específica anti-VCA de baja avidez considerando el tiempo de evolución de las muestras; el título medio de las muestras fue igual en las muestras tomadas antes y después de los siete días de

aparición de los síntomas. Los sueros en que se ha obtenido resultado negativo en el ensayo de avidez están relacionados en la **Tabla IV.10.**

Tabla IV.9.

Resultados obtenidos en el ensayo de avidez de IgG anti-VCA

| Perfil serológico | | | nº de casos | nº de positivos | Título de avidez | | | |
|---------------------|-------|------|-------------|-----------------|------------------|----|----|-----|
| VCA-M | VCA-G | EBNA | | | <4 | 4 | 16 | >64 |
| INFECCION RECIENTE: | | | 94 | 89 (94,7) | 5 | 35 | 34 | 20 |
| + | + | - | 78 | 74 (94,9) | 4 | 30 | 26 | 18 |
| + | + | + | 9 | 9 (100) | 0 | 3 | 5 | 1 |
| - | + | - | 7 | 6 (85,7) | 1 | 2 | 3 | 1 |
| INFECCION PASADA: | | | | | | | | |
| - | + | + | 27 | 2 (7,4%) | 25 | 1 | 1 | 0 |

Por otra parte, al estudiar los 27 casos inicialmente caracterizados como infecciones previas por el VEB, dos casos mostraron anticuerpos de baja avidez, con títulos de 1:4 y 1:16 (muestras 1672 y 2338 respectivamente, **Tabla IV.10.**). Es de destacar que una de las muestras (2338) fue tomada cuando habían transcurrido 90 días desde el comienzo de la enfermedad.

Tabla IV.10.

Resultados discrepantes en el ensayo de avidéz de IgG anti-VCA

| Muestra | edad (a) | días de evolución | Perfil* | Título de IgG-VCA | |
|------------------------------|----------|-------------------------|-----------|-------------------|----------|
| | | | | sin urea | con urea |
| CASOS CON INFECCION RECIENTE | | | | | |
| 422/8 | 3 | 10 | + / + / - | 1024 | 1024 |
| 201/9 | 5 | 10 | + / + / - | 64 | 32 |
| 269/9 | 4 | sd ¹ | + / + / - | 64 | 64 |
| 854/9 | 2 | 2 | + / + / - | 64 | 64 |
| 1397/8 | 2 | 15 | - / + / - | 64 | 64 |
| CASOS CON INFECCION PREVIA | | | | | |
| 1672/8 | 6 | 4 | - / + / + | 1024 | 64 |
| 2338/8 | 4 | 90 | - / + / + | 256 | 64 |

*Respectivamente IgM-VCA, IgG-VCA, y anti-EBNA

¹sd: sin datos

Así pues, la presencia de anticuerpos IgG anti-VCA de baja avidéz tiene una sensibilidad del 94,7%, y una especificidad del 96,5%, siendo los valores predictivos positivo y negativo el 97,8% y el 91,7%, respectivamente (Tabla IV.11.).

Tabla IV.11.

Características de la detección de anticuerpos IgG anti-VCA de baja avidez en el diagnóstico de la MI

| | | Casos por VEB | |
|------------------------|---|---------------|----|
| | | + | - |
| IgG-VCA de baja avidez | + | 89 | 2 |
| | - | 5 | 55 |

sensibilidad: $89 / 94 \times 100 = 94,7\%$

especificidad: $55 / 57 \times 100 = 96,5\%$

valor predictivo positivo: $89 / 91 \times 100 = 97,8\%$

valor predictivo negativo: $55 / 60 \times 100 = 91,7\%$

En la **Figura IV.16.** se muestra la eficacia de la identificación de IgG anti-VCA de baja avidez como marcador de infección reciente por el virus, en función del grupo de edad. Es de destacar que todos los resultados negativos se han obtenido en niños con edades inferiores a los 6 años, aunque no existen diferencias significativas en ambos grupos de edad.

Finalmente, en la **Figura IV.17.** se muestra el rendimiento de la detección de anticuerpos de baja avidez, de acuerdo con el tiempo de evolución de las muestras.

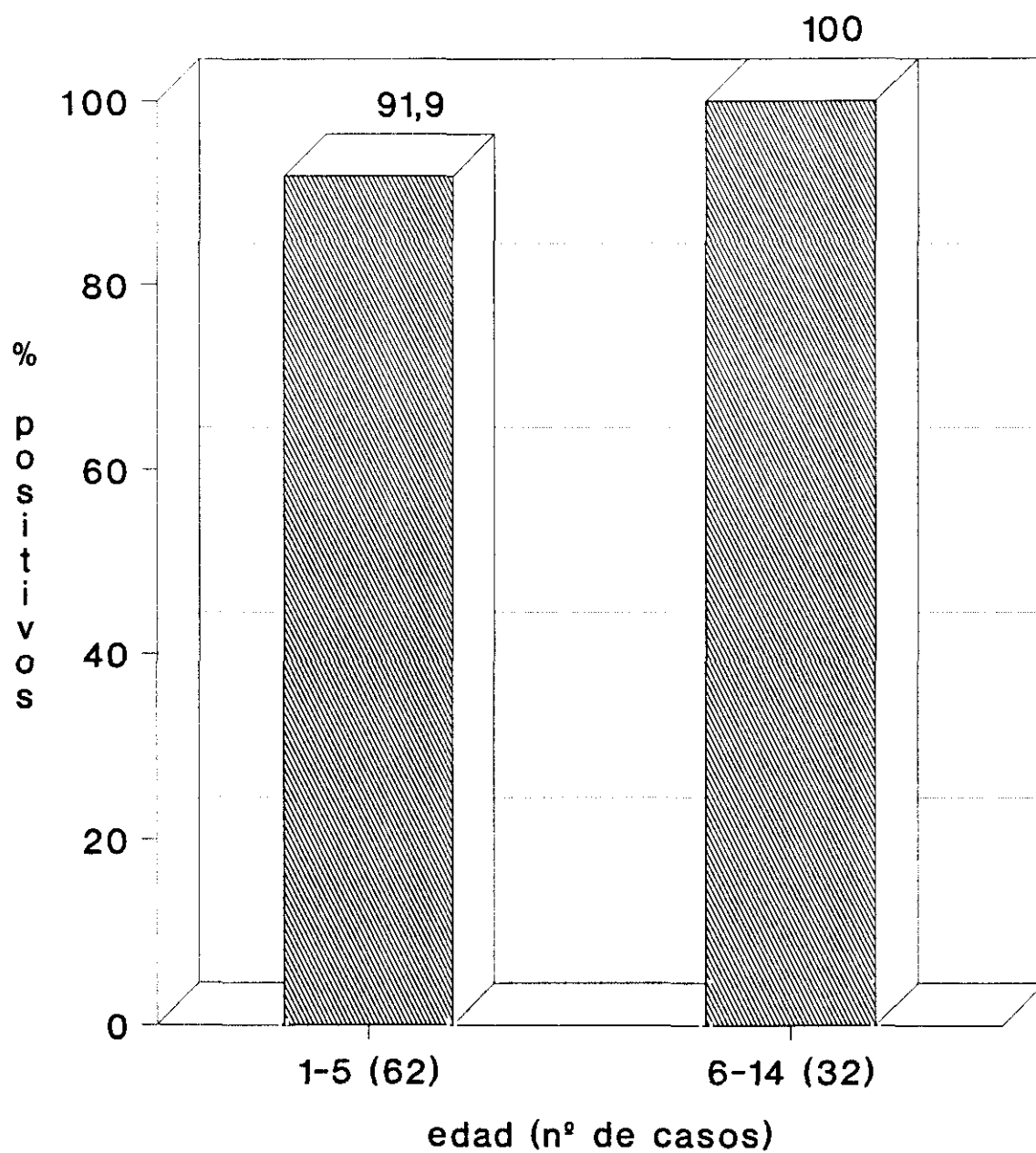


Figura IV.16. Eficacia de la detección de IgG-VCA de baja avidez en el diagnóstico de MI, por grupo de edad

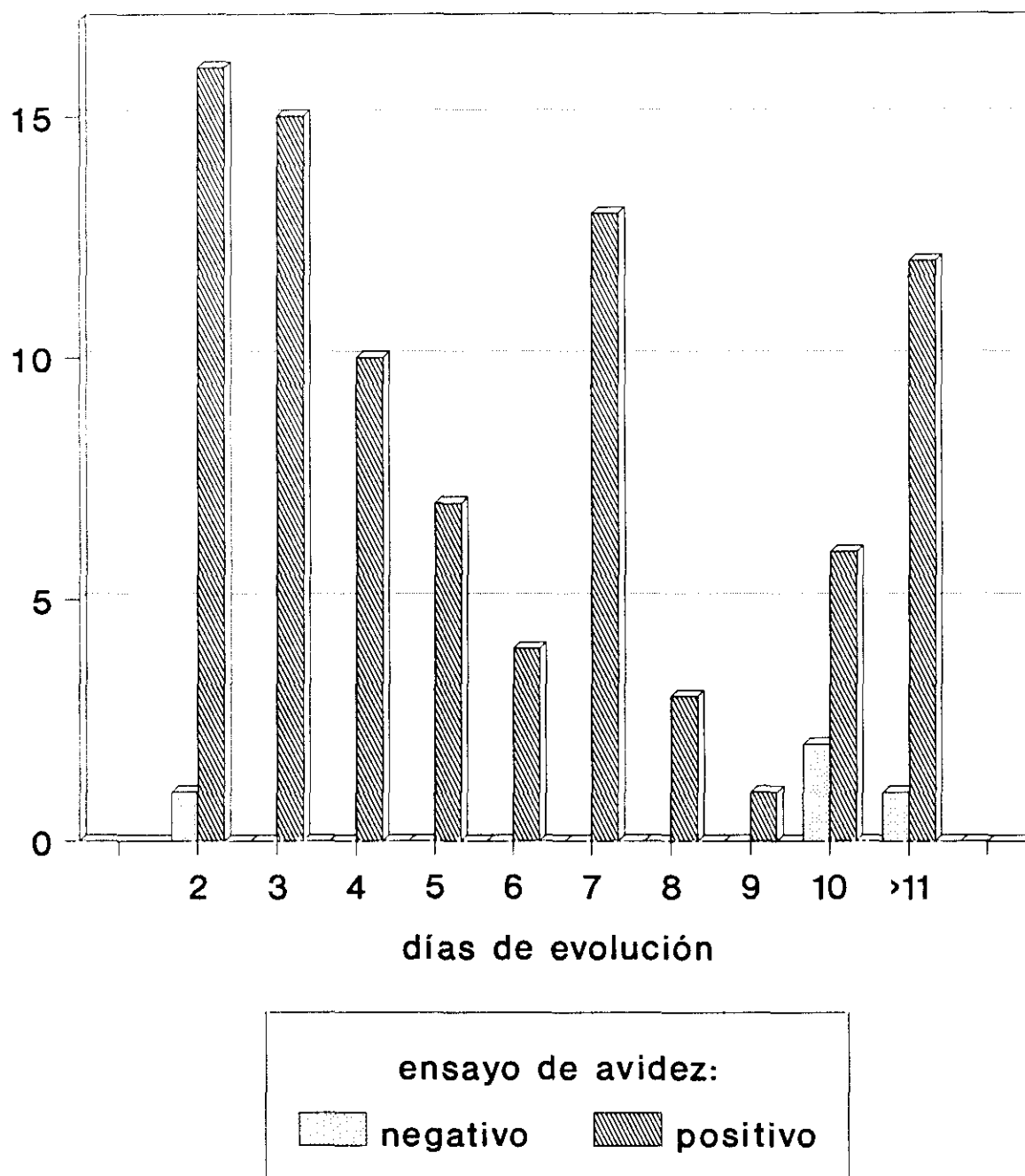


Figura IV.17. Resultados obtenidos en el ensayo de avidéz de IgG anti-VCA en relación con el tiempo de evolución

IV.7. VALORACION DE LA PRESENCIA DE AH EN EL DIAGNOSTICO DE LA MI

En lo que se refiere a la determinación de AH, se ha obtenido resultado positivo en 51 de los 101 casos producidos por el VEB por aglutinación de partículas de látex, con una sensibilidad del 50,5%, y en 52 casos por aglutinación de eritrocitos después de adsorción diferencial, con una sensibilidad del 51,5% en ambos métodos. En los casos sin evidencia serológica específica de infección reciente por el VEB, se ha obtenido resultado negativo en todos los sueros excepto uno, que ha resultado positivo en ambos métodos, en un caso clasificado como no infectado. Así pues, se ha obtenido un valor de especificidad del 98,3% en ambos métodos (Tablas IV.12. y IV.13.).

Tabla IV.12.

Características de la detección de AH por aglutinación de partículas de látex en el diagnóstico de la MI

| Casos por VEB | | |
|-----------------------|----|----|
| | | |
| | | |
| Aglutinación de látex | + | - |
| | 51 | 1 |
| + | 51 | 1 |
| - | 50 | 57 |

sensibilidad: $51 / 101 \times 100 = 50,5\%$

especificidad: $57/58 \times 100 = 98,3\%$

valor predictivo positivo : $51 / 52 \times 100 = 98,1\%$

valor predictivo negativo : $57 / 107 \times 100 = 53,3\%$

Tabla IV.13.

Características de la detección de AH por aglutinación de eritrocitos bovinos después de adsorción diferencial en el diagnóstico de la MI

| | | Casos por VEB | |
|-----------------------------|---|---------------|----|
| | | + | - |
| Aglutinación de eritrocitos | + | 52 | 1 |
| | - | 49 | 57 |

sensibilidad: $52 / 101 \times 100 = 51,5\%$

especificidad: $57 / 58 \times 100 = 98,3\%$

valor predictivo positivo: $52 / 53 \times 100 = 98,1\%$

valor predictivo negativo: $57 / 108 \times 100 = 52,8\%$

En la **Figura IV.18.** se muestra la eficacia de los dos métodos para la detección de AH, en función del grupo de edad. Con ambos métodos se ha obtenido diferencia significativa al comparar los resultados en los niños de 1 a 7, y de 8 a 14 años.

Por último, en la **Figura IV.19.** se representan los resultados positivos obtenidos por los dos métodos según el tiempo de evolución. Aunque el mayor rendimiento se obtiene en las muestras tomadas después de 13 días del comienzo de la enfermedad, las diferencias no muestran significación estadística.

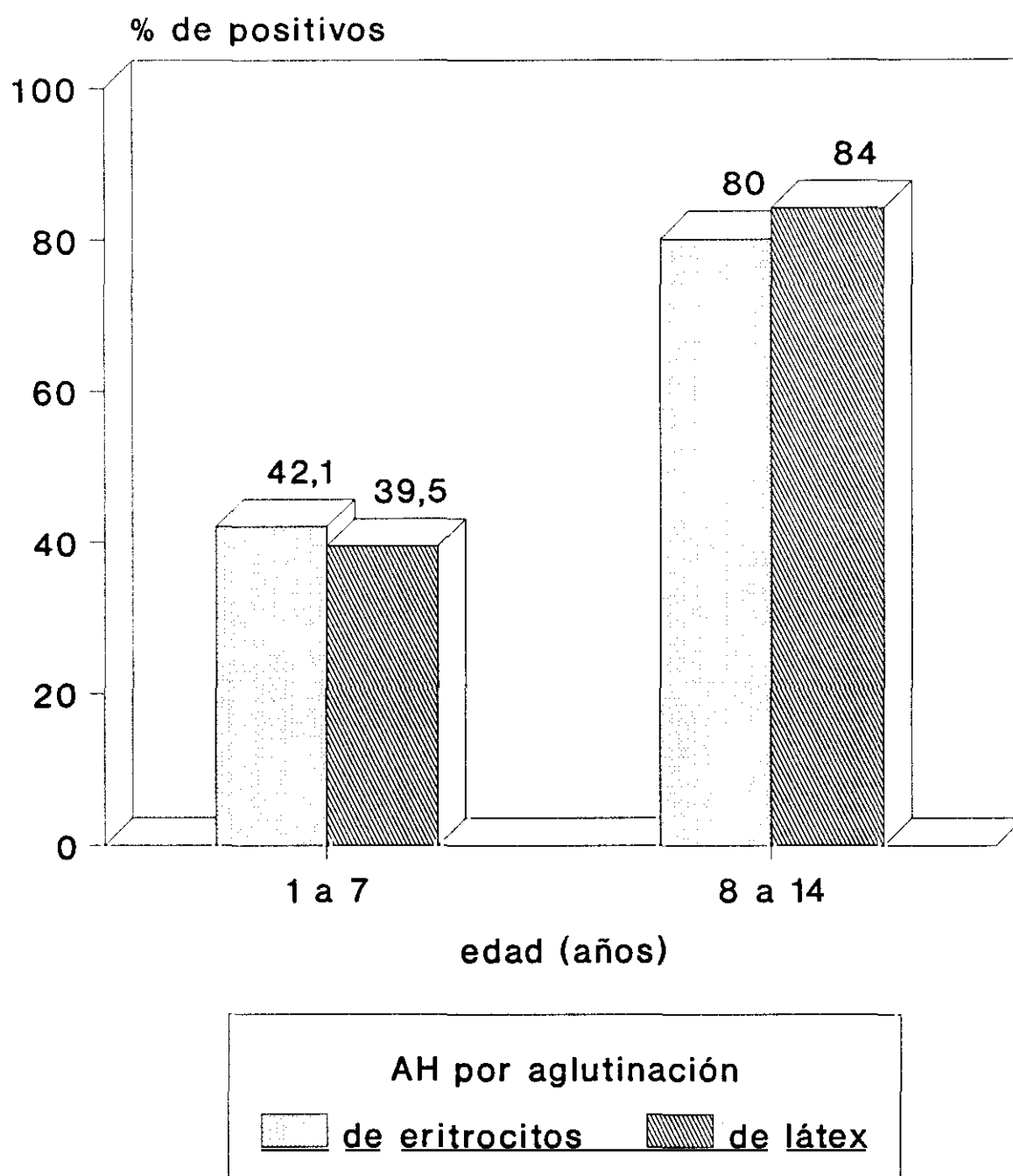


Figura IV.18. Resultados positivos a AH por aglutinación de eritrocitos y de partículas de látex en casos de MI

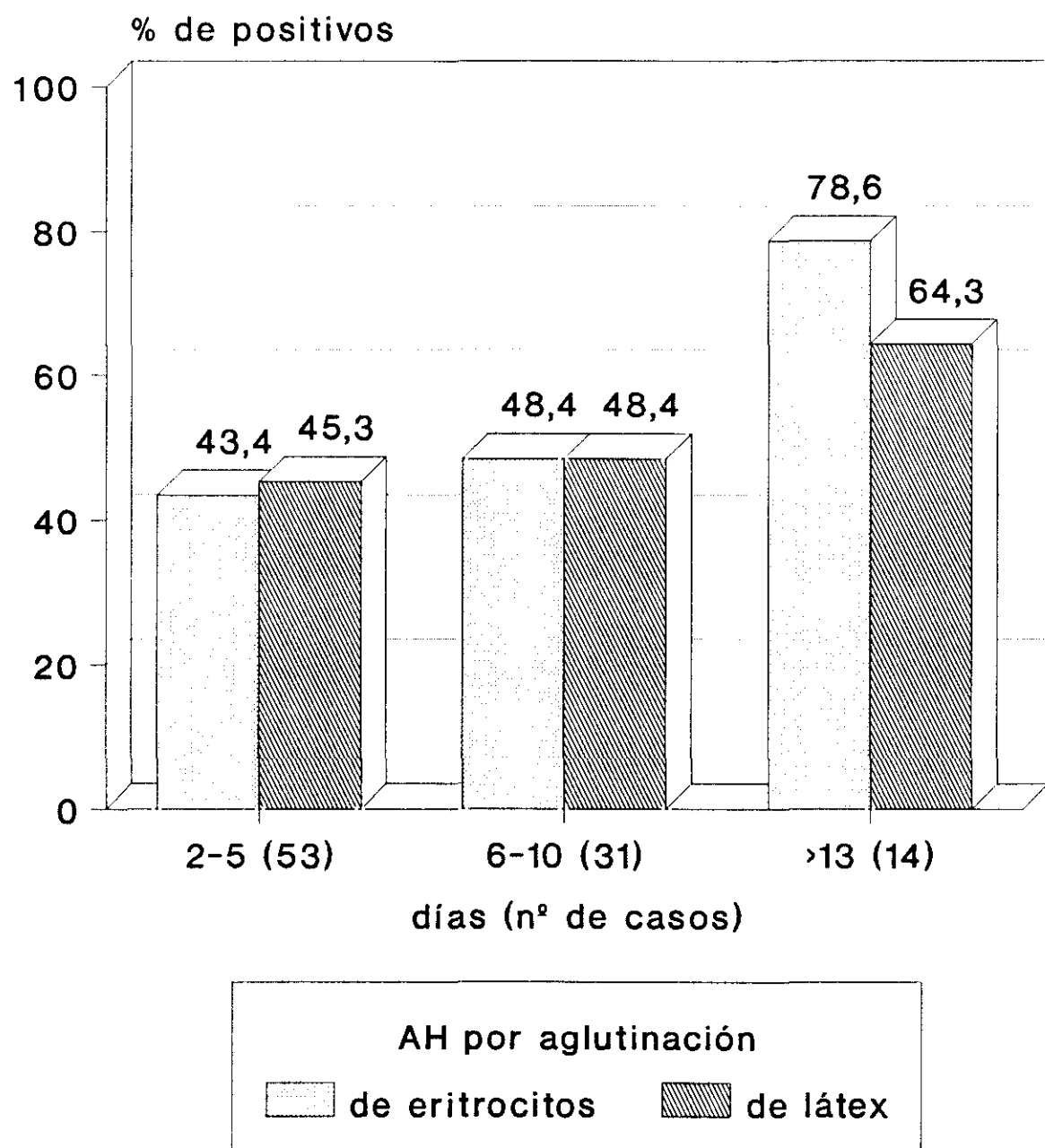


Figura IV.19. Detección de AH en casos de MI, en función del tiempo de evolución de la enfermedad

IV.8. VALORACION GLOBAL DE LOS MARCADORES SEROLOGICOS DE INFECCION POR EL VEB

En la **Tabla IV.14.** se representan los resultados globales obtenidos, según grupos de edad, en los distintos marcadores serológicos, tanto los específicos de la infección por el VEB, como los anticuerpos AH.

En la **Tabla IV.15.** se representan los resultados globales obtenidos, según el tiempo de evolución de la enfermedad, en los distintos marcadores serológicos, tanto los específicos de la infección por el VEB, como los AH.

Tabla IV.14.

Resultados globales obtenidos al estudiar los distintos marcadores serológicos de infección por el VEB, según grupos de edad

| edad | nº | AH | | IgM VCA | IgGVCA EBNA | IgG EA | AVI IFI |
|-------|-----|-------------|-------------|-------------|----------------|-------------|----------------|
| | | eritro | látex | | | | |
| 1 | 6 | 0 0% | 0 0% | 5 83,3% | 6 100% | 4 66,7% | 4/4 100% |
| 2 | 21 | 7 33,3% | 7 33,3% | 18 85,7% | 20 95,2% | 19 90,5% | 16/18 88,9% |
| 3 | 20 | 11 55% | 9 45% | 20 100% | 19 95% | 19 95% | 18/19 94,7% |
| 4 | 14 | 6 42,9% | 6 42,9% | 13 92,9% | 13 92,9% | 14 100% | 12/13 92,3% |
| 5 | 8 | 4 50% | 3 37,5% | 8 100% | 7 87,5% | 6 75% | 7/8 87,5% |
| 6 | 3 | 2 66,7% | 2 66,7% | 3 100% | 3 100% | 3 100% | 3/3 100% |
| 7 | 4 | 2 50% | 3 75% | 3 75% | 4 100% | 4 100% | 4/4 100% |
| 8 | 3 | 3 100% | 3 100% | 3 100% | 3 100% | 3 100% | 3/3 100% |
| 9 | 5 | 4 80% | 4 80% | 5 100% | 4 80% | 4 80% | 5/5 100% |
| 10 | 6 | 4 66,7% | 4 66,7% | 6 100% | 4 66,7% | 6 100% | 6/6 100% |
| 11 | 1 | 1 100% | 1 100% | 1 100% | 1 100% | 1 100% | 1/1 100% |
| 12 | 3 | 3 100% | 3 100% | 3 100% | 3 100% | 3 100% | 3/3 100% |
| 13 | 5 | 4 80% | 4 80% | 4 80% | 3 60% | 5 100% | 5/5 100% |
| 14 | 2 | 1 50% | 2 100% | 2 100% | 2 100% | 2 100% | 2/2 100% |
| TOTAL | 101 | 52 51,5% | 51 50,5% | 94 93,1% | 92 91,1% | 93 92,1% | 89/94 94,7% |

Tabla IV.15.

Resultados globales obtenidos en los distintos marcadores serológicos, según el tiempo de evolución de la enfermedad

| días de evolución | IgM VCA | IgGVCA EBNA | IgG EA | IgGVCA baja avidéz | AH | |
|-------------------|---------|-------------|--------|--------------------|--------|-------|
| | | | | | eritro | látex |
| 2 a 5 | 47/53 | 49/53 | 47/53 | 48/49 | 23/53 | 24/53 |
| | 88,7% | 92,5% | 88,7% | 98% | 43,4% | 45,3% |
| 6 a 10 | 31/31 | 28/31 | 29/31 | 27/29 | 15/31 | 15/31 |
| | 100% | 90,3% | 93,5% | 93,1% | 48,4% | 48,4% |
| más de 13 | 13/14 | 12/14 | 14/14 | 12/13 | 11/14 | 9/14 |
| | 92,9% | 85,7% | 100% | 92,3% | 78,6% | 64,3% |

Por último, en la **Tabla IV.16.** se relacionan los casos en que se ha obtenido resultado discrepante entre los marcadores serológicos específicos de infección por el VEB, constando la edad y el tiempo de evolución. En todos los casos que no tenían IgM anti-VCA, se detectó IgG anti-EA, y en 6 de ellos se obtuvo resultado positivo en el ensayo de avidéz de IgG. Por otra parte, en los 9 casos en que falló el criterio alternativo de clasificación (presencia de IgG anti-VCA en ausencia de anticuerpos frente a EBNA), todos mostraban IgG-VCA de baja avidéz, y en 8 se detectó IgG frente a EA.

Tabla IV.16.

Casos de MI por VEB con resultados discrepantes al estudiar marcadores específicos

| | edad | evol | IgM VCA | IgG VCA | anti EBNA | IgG EA | AH ¹ | AVI IFI |
|--------|------|-----------------|------------|------------|--------------|-----------|-----------------|-----------------|
| 503/8 | 1,2 | 3 | neg | pos | neg | pos | neg | pos |
| 527/9 | 2 | 5 | neg | pos | neg | pos | pos/neg | pos |
| 1397/8 | 2 | 15 | neg | pos | neg | pos | neg | neg |
| 2470/8 | 2,5 | 4 | neg | pos | neg | pos | neg | pos |
| 2335/8 | 4 | 2 | neg | pos | neg | pos | neg | pos |
| 915/8 | 7 | 2 | neg | pos | neg | pos | neg | pos |
| 502/8 | 13 | 2 | neg | pos | neg | pos | neg | pos |
| 1572/8 | 2 | 7 | pos | pos | pos | pos | neg | pos |
| 174/8 | 3 | 2 | pos | pos | pos | pos | pos | pos |
| 1733/8 | 4 | 5 | pos | pos | pos | pos | neg | pos |
| 793/9 | 5 | 10 | pos | pos | pos | pos | neg | pos |
| 423/8 | 9 | 2 | pos | pos | pos | neg | pos | pos |
| 44/9 | 10 | 7 | pos | pos | pos | pos | neg | pos |
| 88/9 | 10 | 4 | pos | pos | pos | pos | neg/pos | pos |
| 2265/8 | 13 | 15 | pos | pos | pos | pos | pos | pos |
| 644/8 | 13 | 120 | pos | pos | pos | pos | pos | pos |
| 1554/8 | 1,5 | 5 | pos | pos | neg | neg | neg | nd ¹ |
| 2393/8 | 1,5 | 8 | pos | pos | neg | neg | neg | pos |
| 179/8 | 2 | 3 | pos | pos | neg | neg | neg | pos |
| 559/8 | 2 | 4 | pos | pos | neg | neg | neg | pos |
| 560/8 | 3 | 5 | pos | pos | neg | neg | pos/neg | pos |
| 380/9 | 5 | 2 | pos | pos | neg | neg | neg | pos |
| 201/9 | 5 | 10 | pos | pos | neg | neg | neg | neg |
| 854/9 | 2 | 2 | pos | pos | neg | pos | pos | neg |
| 422/8 | 3 | 10 | pos | pos | neg | pos | neg | neg |
| 269/9 | 4 | sd ² | pos | pos | neg | pos | pos | neg |

¹Cuando se presentan dos resultados corresponden a aglutinación de eritrocitos y aglutinación de látex, por este orden. nd¹: no determinado. sd²: sin datos.

IV.9. INCIDENCIA DE REACCIONES HETEROLOGAS ENTRE VEB, CMV Y VHH-6 EN MI

Para la valoración de las reacciones heterólogas entre los tres virus, se ha estudiado IgM frente a CMV en los 99 casos caracterizados como producidos por el VEB y en los 5 casos producidos por VHH-6, IgM frente a VCA-VEB en los 4 casos producidos por CMV, y en los 5 casos producidos por VHH-6, e IgM anti-VHH-6 en 3 de los cuatro casos producidos por CMV, en los dos que mostraban infección doble por VEB y CMV así como en catorce de los producidos por el VEB, de los cuales siete presentaban además IgM anti-CMV.

No se ha obtenido ningún resultado IgM positivo a VEB-VCA cuando se estudiaron los casos con infección por CMV y VHH-6.

Por otra parte, al estudiar los 99 casos con infección por VEB se ha obtenido resultado IgM-CMV positivo en 29 (29,3%) (**Tabla IV.17.**). 27 de estos casos cumplían los dos criterios específicos de infección por el VEB previamente definidos (presencia de IgM anti-VCA, y presencia de IgG anti-VCA en ausencia de anticuerpos anti-EBNA) y los dos restantes cumplían sólo uno. Estos dos casos mostraron presencia de IgG anti-VCA de baja avidéz, y el que presentaba sólo IgM anti-VCA mostró tener también AH por las dos pruebas ensayadas, lo que confirma la etiología por VEB en los 29 casos con respuesta IgM anti-CMV y con

evidencia serológica de infección por el VEB. Cuando se estudió la presencia de IgM frente a rubéola en estas 29 muestras en todas ellas se obtuvo resultado negativo.

Estudiando IgG anti-CMV en todos los casos de MI por VEB, excluyendo los dos casos que mostraron infección doble, se encontró resultado positivo en 18 de los 29 (62,1%) que mostraban IgM anti-CMV, así como en 33 de los 70 IgM negativos (47,1%). No se observaron pues diferencias significativas en lo que se refiere a la presencia de IgG anti-CMV entre los casos positivos y negativos a IgM anti-CMV.

Por último, se realizó un ensayo de avidez de IgG anti-CMV en 16 de los 18 casos de mononucleosis por VEB que mostraban simultáneamente IgM e IgG anti-CMV, encontrándose evidencia de IgG específica de alta avidez, indicativa de infección pasada, en los 16 casos (**Tabla IV.17.**).

Tabla IV.17.
Reactividad IgM anti-CMV en casos de mononucleosis infecciosa por VEB*.

| | edad años | evol días | AH ¹ | serología a VEB | | | | serología a CMV | | | |
|--------|--------------|--------------|-----------------|-----------------|-----|--------------|-------------------------|------------------|-----|-----|-------------------------|
| | | | | anti VCA | | anti EBNA | AVI IFI ² | IgM ³ | | IgG | AVI FIA ⁴ |
| | | | | IgM | IgG | | | μ | ind | | |
| 1554/8 | 1,5 | 5 | - | + | + | - | nd [#] | 4,1 | 2,0 | + | nd [#] |
| 1520/8 | 2 | 10 | +/- | + | + | - | nd [#] | 2,8 | 1,2 | + | 0 |
| 1552/8 | 2 | 15 | + | + | + | - | 16 | 1,0 | - | + | 2 |
| 1671/8 | 2 | 3 | +/- | + | + | - | 16 | 3,0 | 1,4 | + | 0 |
| 200/9 | 2,5 | 7 | - | + | + | - | 16 | 1,1 | - | + | 18 |
| 238/9 | 2 | 2 | - | + | + | - | nd [#] | 1,4 | 1,1 | + | nd [#] |
| 544/9 | 2,5 | 10 | - | + | + | - | 16 | 2 | 1,1 | + | 18 |
| 647/9 | 2,5 | 3 | -/+ | + | + | - | 64 | 2,0 | 1,5 | + | 73 |
| 791/8 | 3 | 7 | + | + | + | - | 16 | 1,0 | 1,0 | + | 9 |
| 2041/8 | 3 | 3 | - | + | + | - | 4 | 1,0 | - | + | 2 |
| 185/9 | 3 | 20 | +/- | + | + | - | 4 | 1,8 | 1,0 | + | 13 |
| 453/8 | 4 | 6 | + | + | + | - | nd [#] | 1,2 | 1,2 | + | 0 |
| 1792/8 | 4 | 13 | + | + | + | - | 64 | 3,4 | 1,6 | + | 56 |
| 2334/8 | 4 | 7 | + | + | + | - | 64 | 2,0 | - | + | 0 |
| 41/9 | 5 | 7 | +/- | + | + | - | 4 | 1,2 | - | + | 0 |
| 915/8 | 7 | 2 | - | - | + | - | 64 | 1,0 | - | + | 0 |
| 583/9 | 7 | 7 | -/+ | + | + | - | 4 | 1,2 | - | + | 15 |
| 2052/8 | 11 | 10 | + | + | + | - | 16 | 1,4 | 1,0 | + | 0 |
| 2265/8 | 13 | 15 | + | + | + | + | 64 | 1,0 | - | + | 0 |
| 648/9 | 13 | 30 | + | + | + | - | 4 | 1,2 | - | + | 0 |
| 454/8 | 1 | 30 | - | + | + | - | nd [#] | 2,0 | 1,3 | - | |
| 646/8 | 1,5 | 6 | - | + | + | - | 16 | 2,4 | 1,1 | - | |
| 2393/8 | 1,5 | 8 | - | + | + | - | 4 | 1,7 | - | - | |
| 1030/8 | 2 | 6 | - | + | + | - | 16 | 1,2 | - | - | |
| 184/9 | 2 | 3 | -/+ | + | + | - | 4 | 5,3 | 1,7 | - | |
| 254/8 | 3 | 4 | -/+ | + | + | - | 64 | 1,4 | 1,2 | - | |
| 236/9 | 3 | 3 | - | + | + | - | 4 | 1,0 | - | - | |
| 677/9 | 3 | 10 | + | + | + | - | 4 | 1,8 | 1,3 | - | |
| 934/9 | 3,5 | 15 | + | + | + | - | 4 | 2,0 | 1,1 | - | |
| 239/9 | 4 | 2 | + | + | + | - | 4 | 1,3 | - | - | |
| 629/9 | 7 | 6 | + | + | + | - | 4 | 1,8 | - | - | |

*Incluye los dos casos que mostraban infección doble por VEB y CMV. ¹Cuando se presentan dos resultados corresponden a aglutinación de eritrocitos y aglutinación de látex, por este orden. ²Resultado expresado como reducción en el título después de lavar con urea 8M. ³Resultado expresado como absorbancia de la muestra con respecto al valor de corte. ⁴Resultado expresado como reducción porcentual del título FIAX después de lavar con urea 8M. [#]nd: no determinado.

Al estudiar IgM anti-CMV en los 5 casos producidos por VHH-6, han resultado negativos todos ellos.

Se ha obtenido resultado IgM frente a VHH-6 positivo en uno de los tres casos de infección por CMV (**Tabla IV.18.**). Al realizar una determinación de avidez de IgG frente a VHH-6 se ha evidenciado IgG-VHH-6 de alta avidez, indicándose una infección pasada por VHH-6.

Finalmente, ninguno de los casos de infección por el VEB estudiados, incluidos los dos que mostraban infección doble por el VEB y el CMV, mostró IgM frente a VHH-6.

Tabla IV.18.

Reactividad IgM anti-VHH-6 en un caso de mononucleosis por CMV

| | edad años | evolución días | serología a CMV | | | | serología a VHH-6 | | |
|--------|--------------|-------------------|------------------|-----|-----|--------------------------------------|-------------------|-----|------------------|
| | | | IgM ¹ | | IgG | avidez de IgG FIA ² | IgM | IgG | avidez de IgG |
| | | | μ | ind | | | | | |
| 1010/8 | 2 | 2 | 9,3 | 3,1 | + | 71% | + | + | - |
| 1472/8 | | 30 | 1,9 | 1,4 | + | 50% | - | + | - |

¹Resultado expresado como absorbancia de la muestra con respecto al valor de corte.²Resultado expresado como reducción porcentual del título FIAX después de lavar con urea 8M.

En la **Figura IV.20.** se sumarian esquemáticamente las reacciones cruzadas obtenidas.

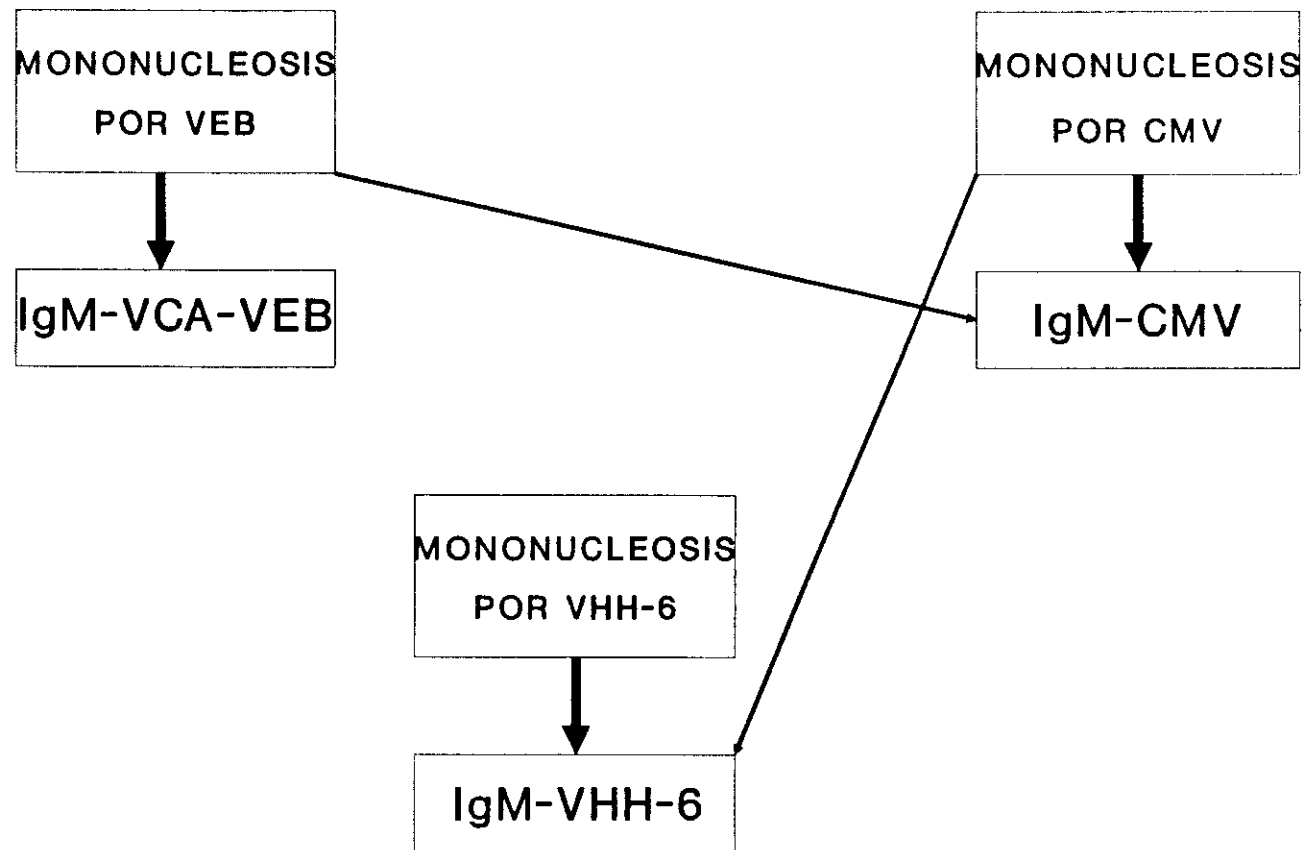


Figura IV.20. Reacción IgM heteróloga entre VEB, CMV y VHH-6 en síndromes mononucleósicos

IV.10. APLICACION DEL PEPTIDO SINTETICO p62 AL DIAGNOSTICO DE LAS INFECCIONES POR VEB

Los resultados globales obtenidos al estudiar IgG e IgM frente al péptido p62 en las 314 muestras de suero se indican en la **Tabla IV.19**. Cuando se estudian sueros de pacientes con evidencia serológica de infección por VEB se logra resultado positivo en 175 de los 249 casos estudiados (70,3%). En los sueros en que además había AH (160 casos, 64,3% de los estudiados) fueron positivos 116 (72,5%), y en los que eran negativos para AH (89 casos) resultaron positivos 59 (66,3%). Por otro lado, han resultado negativos todos los casos de infección por rubéola, así como las mujeres embarazadas estudiadas. En cambio, en 4 de los 11 casos de infección por CMV, así como en 3 de los 20 donantes altruistas de sangre se ha obtenido resultado positivo. Ninguno de estos casos positivos tenía ningún marcador de infección reciente por el VEB.

Tabla IV.19.

Resultados obtenidos al estudiar en 314 muestras de suero anticuerpos IgG e IgM frente al péptido sintético p62.

| Pacientes | nº muestras | nº positivos a p62 (%) |
|--------------------------|----------------|---------------------------|
| ----- | ----- | ----- |
| Infecciones por VEB: | 249 | 175 (70,3) |
| - con AH: | 160 | 116 (72,5) |
| - sin AH: | 89 | 59 (66,3) |
| Infecciones por CMV: | 11 | 4 |
| Infecciones por rubéola: | 9 | 0 |
| Mujeres embarazadas: | 25 | 0 |
| Donantes de sangre: | 20 | 3 |

Las características de sensibilidad y especificidad del método para la diferenciación de IgG e IgM anti-p62 en su aplicación al diagnóstico de infecciones por el VEB se muestran en la **Tabla IV.20.**

Tabla IV.20.

Características de la aplicación del péptido sintético p62 en el diagnóstico de infecciones por VEB

| | | Casos por VEB | |
|--------------------|---|---------------|----|
| | | + | - |
| IgM > IgG anti-p62 | + | 175 | 7 |
| | - | 74 | 57 |

sensibilidad: $175 / 249 \times 100 = 70,3\%$

especificidad: $57 / 64 \times 100 = 89,1\%$

valor predictivo positivo: $175 / 182 \times 100 = 96,2\%$

valor predictivo negativo: $57 / 131 \times 100 = 43,5\%$

En la **Tabla IV.21.** y en la **Figura IV.21.** se muestran, por fin, los valores de sensibilidad del método, así como de la detección de AH en los diferentes grupos de edad. El método para la diferenciación de IgG e IgM anti-p62 ha mostrado ser significativamente más sensible que la detección de AH en los menores de 5 años ($P < 0,01$).

Tabla IV.21.

Resultados positivos (%) obtenidos por el método que diferencia respuestas IgG e IgM frente al péptido sintético p62 y para AH en 239 muestras de suero de infecciones por VEB, agrupados de acuerdo con la edad.

| Positivos en: | nº de positivos (%) por grupo de edad | | | | |
|------------------|---------------------------------------|------|-------|-------|-----|
| | 0-5 | 5-10 | 10-15 | 15-20 | >20 |
| p62 | 59 | 51 | 22 | 18 | 21 |
| | 61,5 | 75 | 71 | 94,7 | 84 |
| AH | 38 | 47 | 29 | 15 | 25 |
| | 39,6 | 69,1 | 93,5 | 78,9 | 100 |

Como se observa en la **Tabla IV.21.**, en el grupo de menores de 5 años la sensibilidad de la medida de anti-p62 es del 61,5%, frente al 39,6% de los AH. En el grupo de 5 a 10 años es del 75% frente al 69,1%, en el de 10 a 15 años el 71% frente al 93,5%, en el de 15 a 20 años el 94,7% frente al 78,9%, y, por fin, en el de mayores de 20 años el 84% frente al 100%.

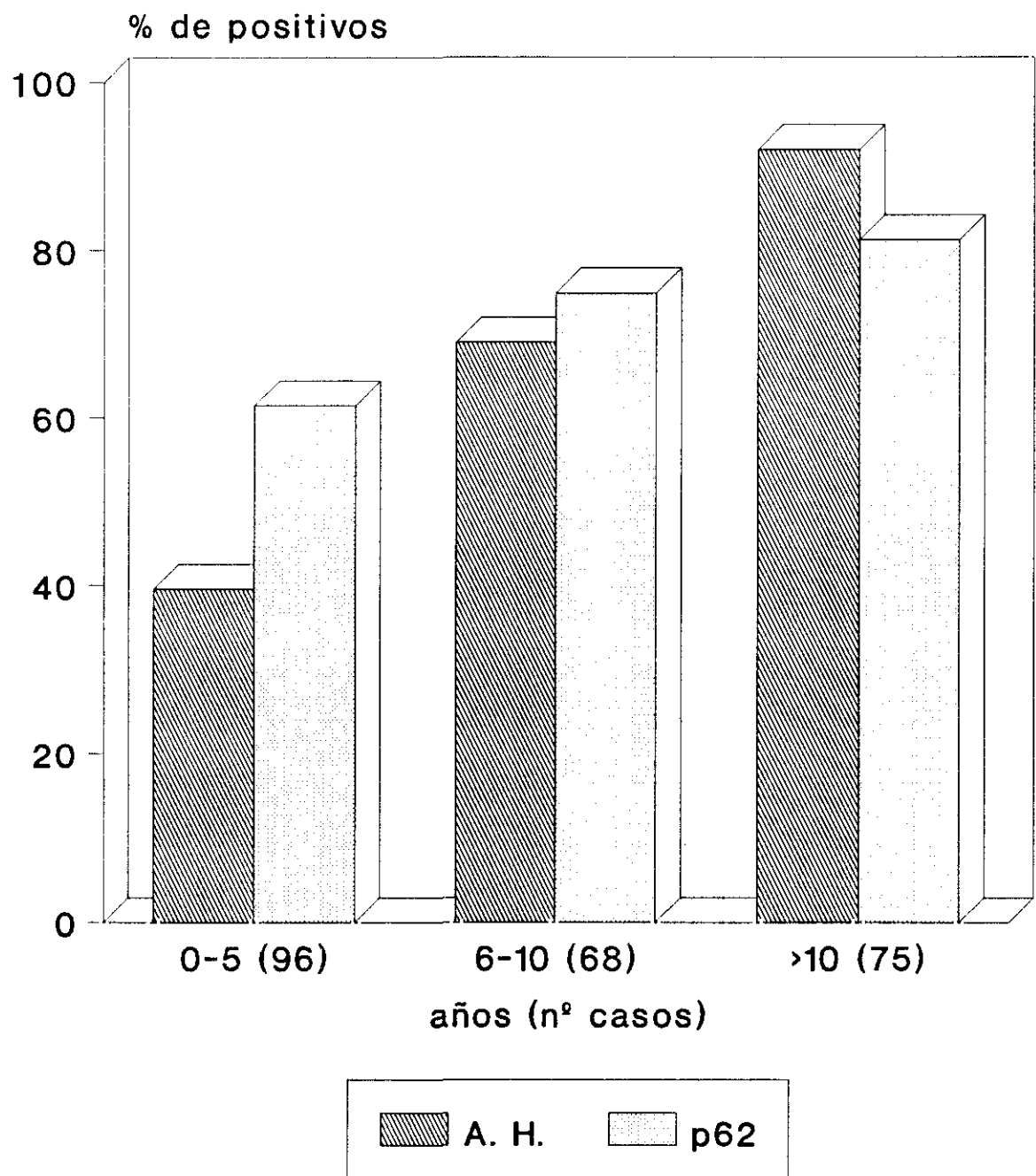


Figura IV.21. Diagnóstico de infecciones por VEB con el uso del péptido p62 con respecto a los AH, según grupo de edad

IV.11. APLICACION DE LOS ENSAYOS QUE DETERMINAN IgG E IgM FRENTE A LAS PROTEINAS RECOMBINANTES p54 Y p138 DE EA E IgG FRENTE A LA p72 DE EBNA

Se ha empleado 64 muestras de niños con MI, de los que 49 mostraban evidencia serológica de infección primaria reciente y 8 de infección pasada por el VEB, así como 4 muestras de infección primaria por VHH-6, y 3 de primoinfecciones por CMV.

Los resultados obtenidos al ensayar las muestras de infecciones primarias e infecciones previas por VEB se muestran en la **Tabla IV.22.**

La **Tabla IV.23.** presenta la clasificación final de las muestras reflejadas en la **Tabla IV.22.** De acuerdo con los resultados de las muestras de infección reciente y pasada por VEB, el uso combinado de los tres marcadores estudiados ha permitido la correcta caracterización de 43 de los 49 casos de infección primaria estudiados, con una sensibilidad del 87,8%.

Al ensayar los casos de primoinfección por VHH-6 y CMV se han obtenido perfiles indicativos de infección primaria por VEB en 2 de los 4 casos de VHH-6, así como en 2 de los 3 casos por CMV.

Tabla IV.22.

Resultados obtenidos al ensayar IgG e IgM frente a las proteínas recombinantes p/54 y p/138 de EA, e IgG frente a la proteína recombinante p/72 de EBNA, sobre muestras de MI con infección primaria, reciente o pasada por el VEB

| ensayo con proteínas recombinantes ² | criterio de referencia ¹ | | | |
|---|-------------------------------------|-----------|----------------|-----------|
| | + / + / - | - / + / - | + / + / + | - / + / + |
| + / + / - ^{3a} | 26 | | | |
| + / - / - ^{3b} | 9 | 1 | 1 | |
| + / + / + | 1 ^{3c} | | 1 ⁴ | |
| - / + / - ^{3d} | 1 | 3 | | |
| - / + / + ^{3d} | 1 | | | |
| + / - / + ⁴ | | | | 1 |
| - / - / + ⁵ | | 1 | | 1 |
| - / - / - ⁶ | 3 | 1 | | 6 |

¹Respectivamente IgM e IgG anti-VCA y anticuerpos anti-EBNA. Los tres primeros perfiles indican infección primaria; el cuarto infección pasada.

²Resultados obtenidos en las determinaciones de IgM e IgG frente a p/54 y p/138, e IgG frente a p/72, respectivamente.

^{3a}Infección primaria por VEB

^{3b}Infección primaria por VEB, muestras tempranas.

^{3c}Infección primaria por VEB, considerando el resultado frente a EBNA positivo bajo.

^{3d}Infección primaria por VEB, muestras tardías.

⁴Reactivación aguda por VEB

⁵Infección pasada por VEB

⁶No infección por VEB.

Tabla IV.23.

| Clasificación de casos en ensayos recombinantes | Criterio de referencia | |
|---|------------------------|-----------------------|
| | Positivo ¹ | Negativo ² |
| Infección primaria | 43 | 1 |
| Reactivación aguda | 1 | 1 |
| Infección previa | 1 | 6 |
| Ausencia de infección | 4 | 0 |

¹Infección reciente por el VEB definida por presencia de IgM anti-VCA y/o presencia de IgG anti-VCA en ausencia de anticuerpos anti-EBNA.

²Infección pasada por VEB, definida por presencia de IgG anti-VCA y de anticuerpos anti-EBNA, en ausencia de IgM anti-VCA.

IV.12. MARCADORES SEROLOGICOS DE INFECCION POR VEB EN NIÑOS VIH POSITIVOS, EN RELACION CON LA PRESENCIA DE NEUMONIA INTERSTICIAL LINFOIDE

En las **Tablas IV.24. y IV.25.** se presentan los resultados serológicos frente a VEB obtenidos en los niños VIH positivos con y sin neumonía intersticial linfoide, respectivamente.

Todos los niños estudiados presentaban evidencia de infección previa por VEB. En todos los casos de niños que presentaban neumonía intersticial linfoide (**Tabla IV.24.**) se presentaron perfiles serológicos atípicos; tres de ellos mostraron pérdida de anticuerpos anti-EBNA, y los dos restantes presentaron presencia perdurable de IgM anti-VCA. Tres de ellos, igualmente, presentaban títulos altos, superiores a 1/160, mantenidos, de IgG frente al antígeno temprano.

Por otra parte, entre los niños VIH positivos que no presentaban neumonía intersticial linfoide (Tabla IV.25.) también se presentaban patrones serológicos atípicos, aunque con menor frecuencia: ninguno mostró presencia de IgM anti-VCA, y los títulos de IgG anti-EA eran aparentemente más bajos (en los tres casos que se ensayaron se obtuvieron títulos de 1/10 mantenidos). El único perfil atípico que se presenta es la desaparición de anticuerpos anti-EBNA, que se obtuvo en tres casos.

Tabla IV.24.

Estudio serológico frente a VEB en niños VIH positivos con neumonía intersticial linfoide

| Caso | Fase clínica | Fecha NIL | Edad | p24 ¹ | IgG VCA | anti EBNA | IgM VCA | IgG EA ² |
|-------|--------------|--------------|-------|------------------|------------|--------------|------------|------------------------|
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | --- | ----- | --- | ----- |
| 1 | P2AC | 2 a | 3 a | neg | pos | pos | neg | 10 |
| | | | 4 a | neg | pos | pos | neg | 10 |
| | | | 5 a | 80 | pos | neg | neg | 10 |
| 2 | P2AC | 2 a | 3 a | neg | pos | pos | pos | >160 |
| | | | 4 a | neg | pos | pos | pos | >160 |
| | | | 5 a | neg | pos | pos | pos | >160 |
| 3 | P2AC | 2 a | 4 a | neg | pos | pos | neg | 10 |
| | | | 5 a | neg | pos | neg | neg | ND* |
| 4 | P2AC | 2 a | 4 a | 133 | pos | neg | neg | >160 |
| | | | 5 a | 315 | pos | neg | neg | >160 |
| 5 | P2AC | 2 a | 3 a | 99 | pos | pos | pos | >160 |
| | | | 4 a | neg | pos | pos | pos | >160 |
| | | | 5 a | 110 | pos | pos | pos | >160 |

¹ en pg/ml

² inverso del título

* ND: no determinado

Tabla IV.25.

**Estudio serológico frente a VEB en niños VIH positivos
sin neumonía intersticial linfoide**

| Caso | Fase clínica | Edad | p24 ¹ | IgG VCA | anti EBNA | IgM VCA | IgG EA ² |
|------|-----------------|-------|------------------|------------|--------------|------------|------------------------|
| ---- | ----- | ----- | ---- | --- | ---- | --- | --- |
| 6 | P2AD2 | 3 a | neg | pos | pos | neg | 10 |
| | | 4 a | neg | pos | pos | neg | 10 |
| | | 5 a | neg | pos | neg | neg | 10 |
| 7 | P2AD2 | 3 a | neg | pos | pos | neg | 10 |
| | | 4 a | neg | pos | pos | neg | 10 |
| | | 5 a | neg | pos | neg | neg | 10 |
| 8 | P2AD2 | 4 a | neg | pos | pos | neg | 10 |
| | | 5 a | neg | pos | neg | neg | 10 |
| 9 | P2AD2 | 3 a | neg | pos | pos | neg | ND* |
| | | 4 a | neg | pos | pos | neg | ND* |
| | | 5 a | neg | pos | pos | neg | ND* |
| 10 | P2AD2 | 4 a | neg | pos | pos | neg | ND* |
| | | 5 a | neg | pos | pos | neg | ND* |
| 11 | P2AD2 | 3 a | neg | pos | pos | neg | ND* |
| | | 4 a | neg | pos | pos | neg | ND* |
| | | 5 a | neg | pos | pos | neg | ND* |

¹ en pg/ml

² inverso del título

* ND: no determinado

V. DISCUSSION

V.1. SEROEPIDEMIOLOGIA DE LAS INFECCIONES POR VEB, CMV Y VHH-6

La seroprevalencia en población adulta frente a VEB, CMV y VHH-6 ha sido estudiada en varios países, pero, al contrario de lo que sucede con otros virus o patógenos, no se conoce en detalle el nivel de inmunidad que existe en nuestro país frente a los tres virus. De los tres el mejor estudiado es el CMV, debido fundamentalmente a su importancia como agente teratógeno, y como agente productor de infección grave en el paciente inmunodeprimido.

Estudios previos en mujeres gestantes frente a CMV ofrecen una seroprevalencia del 70,53% en un estudio realizado en la provincia de Madrid (Cour y cols., 1988), y del 73,31% en mujeres embarazadas en Cataluña (Pumarola y cols., 1989). En el presente estudio (**Tabla IV.1.**) se obtiene una cifra levemente superior (81%), que sería explicable en base a una sensibilidad superior del procedimiento empleado (ELISA), en relación con la técnica de FC utilizada en los dos estudios anteriores. Por otra parte, se ha planteado la existencia de una seroprevalencia superior en mujeres embarazadas, con respecto a las no gestantes. De hecho, Cour y cols. (1988) encuentran una diferencia significativa entre estos dos grupos de mujeres. Si bien no se dispone en este estudio de un grupo de mujeres no embarazadas, de la comparación de la seroprevalencia en embarazadas y en donantes sanos (81%

frente a 75%) se puede derivar una conclusión similar, aunque no existe significación estadística en la diferencia. Una posible explicación a estos resultados está en el hecho de que el embarazo potencia la reactivación del CMV latente, con elevaciones en los títulos de anticuerpos específicos. Tales reactivaciones pueden ser favorecidas por la depresión en la respuesta inmune celular durante la última parte del embarazo (Kumar y cols., 1984), o por los cambios hormonales que tienen lugar durante la gestación (Mackowiak y cols., 1987)

En lo que se refiere al VEB se obtienen proporciones de seropositividad del 97,5% en las mujeres embarazadas, y del 99% en los donantes de sangre (**Tabla IV.1.**), que confirman la ubicuidad de la infección por el virus, y son similares a las halladas por Fleisher y Bolognese (1982), que encuentran proporciones superiores al 96% de seropositividad en mujeres embarazadas, aunque más altos que los obtenidos en España en población general por Cour y cols. (1991), que encuentran rangos de seropositividad en adultos de poblaciones de la zona centro entre el 85% y el 90%, y por Barranco y cols. (1991), que obtienen el 83,2% en adultos catalanes.

El porcentaje de mujeres embarazadas seropositivas frente a VHH-6 (85,4%) (**Tabla IV.1.**) ocupa una posición intermedia con respecto al obtenido frente a los otros dos virus. Esta cifra está en el rango referido por Ranger y

cols., (1991) al estudiar mujeres embarazadas de diferentes países. Estos autores obtienen seroprevalencias que varían entre el 20% en Marruecos, y el 90% en Congo. La seroprevalencia de este estudio es muy similar a la de mujeres del único país europeo incluido en el estudio (Francia) (76%). Otros estudios ofrecen proporciones de seropositividad del 47% de donantes de sangre varones (Fox y cols., 1988) y el 67% en jóvenes adultos sanos (Brown y cols., 1988). El único estudio realizado en España en donantes de sangre ofrece un 35% de positivos al VHH-6, debiendo considerarse el reducido número de muestras estudiadas (35) (Civeira y cols., 1989).

Es un hecho bien conocido que los anticuerpos IgG, a diferencia de otros isotipos, atraviesan de forma activa la placenta de forma que, al nacimiento, el recién nacido presenta en suero títulos de anticuerpos IgG específicos contra patógenos a los que ha estado expuesta la madre iguales o ligeramente superiores a los títulos que presenta la madre (Griffiths y cols., 1982; Lennon y Black, 1986). Estos anticuerpos transferidos de la madre al niño son metabolizados durante los primeros meses de la vida, y protegen de la infección por los patógenos homólogos hasta el momento de su desaparición. Se ha encontrado que la vida media de los anticuerpos antisarampión adquiridos pasivamente de la madre es de 48,4 días (Lennon y Black, 1986). La detección de IgG específica frente a un determinado virus en niños en los primeros meses de la

vida, por tanto, define la inmunidad a la primoinfección por el virus correspondiente. Los estudios realizados en grupos numerosos de muestras de niños de estas edades, o sobre muestras de seguimiento de niños sanos nacidos de madres con anticuerpos, son de gran utilidad desde el punto de vista epidemiológico, ya que permiten el conocimiento de la edad en que se empiezan a producir primoinfecciones, y son especialmente útiles para establecer la edad a la que se deben aplicar vacunas frente a virus.

La seroprevalencia frente a CMV en mujeres embarazadas y niños de 0 a 2 meses es equivalente (81% frente al 75%) (**Figura IV.3.**). Igual sucede con los títulos medios de las muestras tomadas la primera semana de seis niños a los que se ha hecho seguimiento y sus madres (1992 frente a 1852) (**Figura IV.5.**). En cambio, en lo que se refiere al VEB, la diferencia entre las embarazadas y los niños de 0 a 2 meses (97,5% frente al 83,3%) (**Figura IV.2.**) sí mostró significación estadística, aunque el valor de P obtenido ($P=0,009$) era muy cercano al valor límite de significación considerado a todo lo largo del estudio (0,01). Por otra parte, las muestras de niños de menos de 7 días mostraban títulos medios de anticuerpos ligeramente inferiores a los de sus madres (240 frente a 320) (**Figura IV.5.**). Estos resultados sugieren que los niveles de anticuerpos transferidos por las mujeres a sus hijos son más altos en el caso de CMV que en el de VEB.

Por otra parte, al estudiar los sueros para VHH-6 se observa una proporción baja de niños seropositivos en el primer grupo de edad considerado (0-3 meses) (50%), comparada con la que se obtiene en mujeres embarazadas (85,4%) (**Figura IV.4.**), siendo esta diferencia significativa ($P=10^{-6}$). Algo similar sucede al comparar los títulos en los niños menores de 7 días y sus madres (73 frente a 117) (**Figura IV.5.**). La justificación a este hecho está en que conforme avanza la edad se produce una caída en el título de anticuerpos frente a VHH-6 (Brown y cols., 1988). De hecho, las muestras de las madres estudiadas mostraron títulos más bajos frente a VHH-6 que frente a los otros dos virus, lo que hace que se transfieran de la madre concentraciones bajas de anticuerpos anti-VHH-6 que, como se verá más adelante, se metabolizan antes.

En general, los títulos de anticuerpos detectados en sangre de cordón de niños son mayores que los de sus madres. Sólo en función de la existencia de inhibidores inespecíficos se encuentra lo contrario en gripe A utilizando la inhibición de la hemaglutinación (Griffiths y cols., 1986). En el presente estudio los títulos son equivalentes, en el caso de CMV, o ligeramente inferiores en los niños, casos de VEB y VHH-6. Este resultado sería explicable por el hecho de ser muestras de suero tomadas en la primera semana, y no tratarse de sangre de cordón.

La IgG anti-VCA-VEB de origen materno permanece

detectable hasta los 8 meses de edad. A partir de los 9 meses, por otra parte, se empiezan nuevamente a detectar niños seropositivos (**Figura IV.2.**). En lo que se refiere a CMV se observa un patrón similar, dado que se detecta presencia de IgG específica, presumiblemente procedente de la madre, hasta los 9 meses, observándose nuevamente seropositivos a partir de los 10 meses de edad (**Figura IV.3.**). Los patrones obtenidos frente a VEB y CMV concuerdan con los obtenidos para otros virus. Estudios realizados con el objeto de dilucidar la fecha más adecuada para la administración de la vacuna antisarampión o triple vírica (rubéola, sarampión y parotiditis), encuentran que la duración de anticuerpos maternos frente a rubéola y parotiditis es hasta los 8 y 7 meses respectivamente (de Ory y cols., 1987), y que los anticuerpos anti-sarampión son detectables hasta los 6 ó 7 meses, dependiendo del nivel de sensibilidad de la técnica serológica empleada (Echevarría y cols., 1984; de Ory y cols., 1987). La variación de la proporción de seropositivos a VEB y CMV es, sin embargo, diferente: en tanto que para VEB es muy brusca (desde el 83,3% a los 0-2 meses, al 6,1% a los 4-8 meses) (**Figura IV.2.**), para CMV es más pausada, variando desde el 75% a los 0-2 meses hasta el 38,5% entre 6 y 9 meses (**Figura IV.3.**).

En lo que se refiere al VHH-6, se observa una disminución muy acusada en la proporción de positivos desde el nacimiento hasta los 3 y 4 meses, en que sólo hay un

4,5% de positivos. La duración de los anticuerpos específicos tan corta en comparación con lo que sucede con CMV y VEB tendría su explicación en que al ser menor en las mujeres embarazadas la concentración de IgG frente al VHH-6 que frente a los otros dos virus, se metabolizan más rápidamente. De cualquier forma, estas cifras resultan coherentes con las referidas por Briggs y cols. (1988), que encuentran porcentajes que disminuyen desde el 41% en menores de 2 meses hasta el 7% en niños de 4 y 5 meses.

Por otra parte, los resultados obtenidos sugieren que las primoinfecciones por VEB (**Figura IV.2.**) y CMV (**Figura IV.3.**) se empiezan a producir entre los 9 y 10 meses de edad, en tanto que las producidas por VHH-6 lo hacen a partir de los 4 meses (**Figura IV.4.**).

En lo que se refiere a VEB (**Tabla IV.2.**), a partir de los 9 meses se empiezan nuevamente a detectar niños seropositivos, siendo la proporción del 20,4% entre 9 y 16 meses y del 36,7% entre 15 y 24 meses, detectándose títulos altos, superiores a 1:128, de forma más frecuente en los niños mayores de 9 meses que en los menores de esa edad, pudiendo considerarse, por tanto, que han sufrido infección por el virus de forma más reciente. Las variaciones en la proporción de seroprevalencia al virus en niños de estas edades en diferentes poblaciones son grandes. En países en vías de desarrollo la prevalencia de anticuerpos puede ser tan alta como el 80% a los dos años,

como sucede en Ghana (Biggar y cols., 1978), en tanto que en niños fineses es el 10,5% (Tallqvist y cols., 1973).

Al estudiar las muestras a CMV (**Tabla IV.3.**), los resultados son similares: el 27,7% de las muestras tomadas entre 10 y 15 meses y el 40% de las tomadas entre 15 y 24 meses resultaron positivas. Existe una gran variación en las proporciones de seropositivos en estas edades en diferentes localizaciones geográficas, de hecho, en el grupo de edad de 13 a 24 meses, se encuentran cifras que oscilan entre el 0%, en Oxford (Inglaterra) y el 100%, en Entebbe (Uganda) (Krech y Tobin, 1981). Las cifras obtenidas en el grupo de edad de 15 a 24 meses en el presente estudio (40%) resultan similares a las obtenidas en ciudades europeas, caso de Friburgo (Suiza) (38,5%), Bratislava (Eslovaquia) (40,7%) y Roma (Italia) (51,3%) (Krech y Tobin, 1981).

Los resultados obtenidos frente a VEB y CMV en este estudio son similares a los obtenidos para los virus rubéola y parotiditis en un estudio previo (de Ory y cols., 1987), en el que se encuentra que en el período que transcurre entre el momento en que ya no son detectables los anticuerpos de origen materno y el momento en que se administra la vacuna triple vírica (15 meses), ha sido naturalmente infectado el 24,2% de los niños por el virus de la rubéola y el 13,9% por el virus parotiditis. La comparación con el virus del sarampión no se puede realizar

con fidelidad, teniendo en cuenta que el calendario de vacunación vigente en nuestro país en la fecha en que el citado estudio se llevó a cabo incluía, aparte de la administración de la vacuna triple vírica a los 15 meses, la recomendación de vacunación frente al sarampión de los niños en especial riesgo a los 9 meses.

Por otra parte, es a partir del cuarto mes de edad cuando se empiezan a observar seropositivos a VHH-6 (**Tabla IV.4.**), siendo desde esa edad la proporción de seropositivos superior al 40%, alcanzando el 62,8% en los niños entre 1 y 2 años. Este porcentaje es muy similar al obtenido en niños de esas edades por Briggs y cols. (1988), que encuentran el 60% de seroprevalencia.

Así pues, los resultados obtenidos en este grupo de muestras indican que los tres virus infectan de forma muy precoz a los niños de nuestro medio, siendo el VHH-6 el que produce la infección más temprana, a partir del cuarto mes, y reproduciendo los VEB y CMV el patrón de infección que producen los virus rubéola, sarampión y parotiditis. Por estas causas, es esperable que estos virus participen en síndromes mononucleósicos en niños pequeños.

V.2. PARTICIPACION DE VEB, CMV Y VHH-6 EN SINDROMES MONONUCLEOSICOS EN LA INFANCIA

La mononucleosis es una entidad clínica diferenciada,

entre cuyos agentes etiológicos clásicamente considerados figuran el VEB, el CMV, *T. gondii*, y a los que recientemente se ha incorporado el VHH-6. Sin embargo, es muy limitada la información de que se dispone en lo que se refiere a la participación relativa de los tres virus en el síndrome. De hecho, el mayor estudio realizado, llevado a cabo en Finlandia sobre 555 casos presenta al VEB como el responsable del 92% de casos de mononucleosis, seguido por CMV (6,8%) (Nikoskelainen y cols., 1974). Sin embargo, hay que resaltar que estas cifras proceden de un estudio retrospectivo, y que incluyen casos de MI en todos los grupos de edad.

Por otra parte, desde la descripción del VHH-6 (Salahuddin y cols., 1986) y de su relación como agente responsable del exantema súbito (Yamanishi y cols., 1988), se anticipó la posibilidad de que participara en la etiología de la MI. Niederman y cols. (1988) describen tres casos en adultos, en tanto que los casos descritos por Steeper y cols. (1990) no ocurren exclusivamente en niños, y los referidos por Bertram y cols. (1988) se presentan en individuos mayores de 12 años. Por otra parte, ha sido el VHH-6 identificado como responsable del 14% de los síndromes febriles en menores de 2 años, en su mayoría en ausencia del exantema típico de la roséola (Pruksananonda y cols., 1992). Es muy importante, pues, el disponer de resultados que reflejen la incidencia relativa real de los tres virus en síndromes mononucleósicos infantiles.

Al estudiar los 159 casos para los herpesvirus VEB, CMV, y VHH-6 ha sido posible la identificación etiológica por alguno de los tres virus en 110 casos (69,2%), resultando negativos los 49 restantes (30,8%) (**Tabla IV.7.**). Noventa y nueve han sido producidos por VEB (62,3% del total, 90% de los positivos), 4 por CMV (2,5% del total, 3,6% de los positivos), 5 por VHH-6 (3,2% del total, 4,5% de los positivos), y dos casos han mostrado evidencia de infección doble por VEB y CMV (1,3% del total, 1,8% de los positivos). Así pues, se han identificado infecciones primarias por VEB en 101 casos (63,5% del total, 91,8% de los positivos), y por CMV 6 casos (3,8% del total, 5,5% de los positivos).

Los casos sin evidencia de infección reciente por ninguno de los tres virus se acumulan fundamentalmente en los niños de 1 (6 de 15, 40%) y 2 años de edad (17 de 41, 41,5%) (**Tabla IV.7.**). Conforme aumenta la edad, se reduce la proporción de casos sin identificación etiológica: en los niños de 3 a 11 años hay 26 negativos de 93 casos (28%), y, por fin, ninguno de los niños de 12 a 14 años ha sido identificado como negativo. Se confirma, pues, el bajo rendimiento del diagnóstico etiológico, incluso en presencia de un diagnóstico clínico claro, realizado con los criterios establecidos por Sumaya y Ench (1985b), cuando se estudian niños de corta edad.

Es llamativo el hecho de que un porcentaje importante

de casos (17,6%) mostraban marcadores serológicos de infección pasada por el VEB, incluso a edades muy tempranas (**Tabla IV.5.** y **Figura IV.8.**)

En lo que se refiere a la edad a la que se producen los casos con identificación etiológica, la proporción de positivos a VEB aumenta conforme la edad aumenta, desde el 40% en niños de 1 año, hasta el 100% en los mayores de 12 años (**Tabla IV.5.**). Los casos producidos por el CMV no guardan en principio relación con la edad, si bien todos se acumulan en menores de 8 años (6 de 85 casos positivos, 7,1%). Por último, y en relación con el VHH-6, los 5 casos positivos están agrupados en los 69 casos positivos en menores de 5 años (7,2%) (**Tabla IV.7.**). Es especialmente llamativa la acumulación de casos producidos por VHH-6 en niños de 1 año (3 de un total de 15 casos, 20%, y de 9 casos negativos al VEB, 33%) (**Figura IV.10.**), lo que concuerda con el hecho ya comentado de que la primoinfección por el VHH-6 se produce muy temprano en la infancia, a partir de los 4 meses.

Teniendo en cuenta el momento en que se produce la infección por los tres virus en la infancia, así como la proporción de casos producidos por VHH-6 y CMV, deben ser estos dos virus considerados, inmediatamente por detrás del VEB, como importantes agentes productores de síndromes mononucleósicos, especialmente el VHH-6 en niños muy pequeños.

V.3. MARCADORES SEROLOGICOS DE INFECCION POR VEB

V.3.1. Anticuerpos heterófilos

Desde su aplicación, aunque con pequeñas modificaciones, la detección de AH ha sido, y aún hoy es, el procedimiento más empleado para el diagnóstico. Probablemente, la modificación más importante introducida ha sido la inmovilización sobre partículas de látex de glicoproteínas de membrana de eritrocitos bovinos purificadas (Levey y cols., 1980). Tal purificación obvia la necesidad de la adsorción diferencial.

En este estudio se ha obtenido un valor de sensibilidad del 50,5% con el método de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas (**Tabla IV.12.**), valor muy similar al obtenido con el ensayo de aglutinación de eritrocitos bovinos después de adsorción diferencial (51,5%) (**Tabla IV.13.**). Estudios previos realizados con el procedimiento de aglutinación de partículas de látex ofrecen unos valores de sensibilidad que varían entre el 65,1% (de Ory y Echevarría, 1990), el 91,6% (Gray y cols., 1992), o superiores al 93% (Tilton y cols., 1988), siendo las diferencias entre estos valores justificables en función de los criterios utilizados para la selección de las muestras, fundamentalmente la edad de los pacientes estudiados.

Una de las causas por las que la MI ha sido considerada una enfermedad poco frecuente en la infancia es la menor frecuencia con la que se presentan los AH en niños, en comparación con los casos en adultos. Se estima que en estos últimos la sensibilidad de la detección de AH es superior al 80% (Fleisher y cols., 1983, de Ory y Echevarría, 1989).

Los valores de sensibilidad de los dos métodos han sido significativamente diferentes en los menores y mayores de siete años ($P < 0,01$) (Figura IV.18.), resultados similares a los de Sumaya y Ench (1985b). También se observa mejor rendimiento en los casos con más de 13 días de evolución, especialmente con el ensayo de aglutinación de eritrocitos (Figura IV.19.).

La especificidad ha sido el 98,3% en ambos procedimientos (Tablas IV.12. y IV.13.), valor similar al obtenido por otros autores estudiando casos de MI en adultos (Fleisher y cols., 1983). Sin embargo, cuando se considera la especificidad de la determinación de AH por aglutinación de partículas de látex, en patologías no relacionadas con el VEB, los resultados obtenidos por diferentes grupos no son coincidentes. Gray y cols. (1992) encuentran con cierta frecuencia resultados falsamente positivos al estudiar muestras de pacientes con infección por parvovirus humano, por hepatitis A o por *Leptospira*, en tanto que de Ory y Echevarría (1990) no encuentran

ningún resultado positivo en pacientes con infección por rubéola o por CMV, ni en mujeres embarazadas ni donantes de sangre.

V.3.2. Marcadores serológicos específicos

Existen dos vías para el diagnóstico serológico de las infecciones víricas: detectando una seroconversión, o un aumento significativo en el título de anticuerpos, entre dos muestras de suero, tomadas en la fase aguda y 10 o 15 días después, o detectando la presencia de anticuerpos específicos del isotipo IgM.

No obstante, ninguna de ambas aproximaciones está completamente libre de problemas. Por una parte, en el momento en que el enfermo acude a la consulta ya son detectables concentraciones de anticuerpos del isotipo IgG, que hace imposible la detección de seroconversión y difícil la del serorrefuerzo. Por otra parte, la detección de IgM anti-VCA se ve complicada por diversos factores que serán discutidos más adelante. La disponibilidad de aproximaciones diagnósticas alternativas a, y/o confirmatorias de, las que habitualmente se emplean es un objetivo importante, siendo muy necesarios los estudios que permitan de forma coherente valorar las diferentes aproximaciones.

El mejor procedimiento serológico para el diagnóstico

de las infecciones producidas por el VEB es la detección de IgM anti-VCA por IFI, que ha sido considerado el más eficaz (Fleisher y cols., 1983). En la actualidad está aceptado como el criterio de referencia. Los casos objeto de este estudio se han clasificado como infección reciente por el VEB utilizando tal criterio, y otro alternativo, basado en la ausencia de anticuerpos anti-EBNA en la fase aguda de la enfermedad en presencia de IgG frente a VCA (Henle y cols., 1974). Este marcador es aplicable en función de la muy frecuente presencia en muestras agudas de IgG anti-VCA, que es superior al 99% cuando se estudian muestras agudas de casos de mononucleosis en niños (Sumaya y Ench, 1985b). Utilizando el criterio que combina la ausencia de anti-EBNA en presencia de IgG anti-VCA, Woodward y Hambling (1986) consiguen diagnosticar 36 de 202 casos (18%) de MI como producidos por el VEB en ausencia de IgM anti-VCA.

En el presente estudio, 85 casos (84,2% de los producidos por VEB) mostraron ambos marcadores de infección empleados. Es importante el hecho de que una proporción de casos fueron clasificados como infección reciente por el VEB en ausencia de IgM (7 casos, 6,9% de los positivos). Sumaya y Ench (1985b) encuentran un 14,2% de casos de mononucleosis infantiles que cursan sin presencia de IgM anti-VCA. Igualmente, existieron otros nueve en los que falló el criterio alternativo, siendo IgM-VCA positivos (8,9%), siempre por presencia precoz de anticuerpos frente

a EBNA. El rendimiento del marcador que combina presencia de IgG anti-VCA en ausencia de anticuerpos frente a EBNA fue superior a la detección de IgM anti-VCA en niños de 1 y 2 años (96,3% frente al 85,2%), en tanto que en todos los restantes grupos de edad, el rendimiento de la detección de IgM anti-VCA ha sido igual o superior (**Figura IV.6.**), no existiendo significación estadística. No se observó tampoco ninguna significación en las diferencias en el rendimiento de ambos marcadores en función del tiempo de evolución (**Figura IV.7.**).

La determinación cualitativa de IgG anti-VCA permite, utilizada conjuntamente con la determinación de anticuerpos anti-EBNA, mejorar el diagnóstico que se obtiene con la simple detección de IgM anti-VCA. Sin embargo, la utilización cuantitativa de este marcador no aporta ningún beneficio al diagnóstico. No han habido diferencias en los títulos medios en las muestras tomadas en la primera semana de evolución o después (**Figura IV.12.**), lo que confirma que cuando se visita al médico ya se ha alcanzado el título máximo de IgG anti-VCA. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Sumaya y Ench (1985b). Tampoco se han observado diferencias en los títulos medios de los casos de infección reciente o pasada por el VEB (**Figura IV.11.**).

La detección de anticuerpos IgG frente al antígeno temprano se considera como un marcador eficaz para el diagnóstico de diversas situaciones clínicas relacionadas

con el VEB. De acuerdo con Sumaya y Ench (1985b), el 84,1% de los niños enfermos presenta en la fase aguda IgG frente a los componentes difuso o restringido del antígeno temprano, siendo en el presente estudio posible la detección de IgG anti-EA en el 92,1% de los pacientes (**Tabla IV.8.**). Sin embargo, como marcador en sí mismo para el diagnóstico de la enfermedad muestra una gran limitación, basada en el hecho de que un porcentaje muy importante (96,4%) de individuos con infección pasada mostraban también presencia de tales anticuerpos, por lo que la especificidad del procedimiento es absolutamente inaceptable (51,7%) (**Tabla IV.8.**).

Cuando se valora la determinación cuantitativa de IgG anti-EA se obtienen resultados que en principio pueden resultar chocantes. Los anticuerpos frente al antígeno temprano se han identificado como indicativos de replicación activa del virus, utilizándose como un marcador de reactivación del virus en determinadas enfermedades que se pretenden relacionar etiológicamente con el VEB, tal es el caso del síndrome de fatiga crónica (Komaroff, 1988). Los títulos medios en el presente estudio de los casos con menos y más de una semana de evolución han sido similares (**Figura IV.12.**), como lo obtenido por Sumaya y Ench (1985b). Lo más difícilmente explicable es la diferencia en los títulos medios en los casos con infección reciente y pasada, considerando todas las muestras estudiadas (1/55 frente a 1/218 respectivamente), así como los distintos

grupos de edad (**Figura IV.13.**). A estos resultados existen dos posibles explicaciones. Primero, que la respuesta frente al antígeno temprano sea lenta, de forma que en la fase aguda de la enfermedad los casos muestren títulos bajos, que aumentan durante la fase convaleciente. De hecho, las muestras de los casos considerados infección pasada son de niños que por su edad han sufrido su infección primaria en un pasado no demasiado lejano, especialmente los menores de 6 años. A favor de esta hipótesis está el dato de que los niños menores de 6 años con infección pasada muestran más frecuentemente que los mayores presencia de IgG anti-EA (**Figura IV.14.**). La segunda explicación es que la respuesta que se ha detectado en los casos de infección pasada en este estudio esté aumentada como consecuencia de sucesivas recurrencias del virus. Sea cualquiera de las dos la explicación, o alguna otra diferente, la respuesta se obtendrá a partir de estudios adicionales, en los cuales se plantee el seguimiento prospectivo de pacientes durante períodos largos de tiempo.

En los últimos años se han desarrollado ensayos con el objeto de caracterizar la avidéz de IgG específica frente a diferentes patógenos, como procedimientos alternativos a los habituales. Dichos ensayos utilizan fundamentalmente las técnicas de IFI y ELISA indirecto, y están basados en el hecho de que la avidéz de la IgG después de la primoinfección es baja, aumentando

rápidamente durante las primeras semanas, más lentamente en los meses subsiguientes (Werblin y cols., 1973). El procedimiento ha mostrado su utilidad como método confirmatorio de infecciones por diversos virus y otros patógenos (Hedman y cols., 1993). Ha sido aplicado a la diferenciación de infecciones primarias y reinfecciones exógenas por rubéola (Thomas y Morgan-Capner, 1988; Hedman y Rousseau, 1989) y VVZ (Schoub y cols., 1992), así como de primoinfecciones y reinfecciones endógenas, en los casos de CMV (Blackburn y cols., 1991) y de VVZ (Kangro y cols., 1991). En algunos casos, la identificación de IgG específica de baja avidéz mejora los procedimientos habituales; en el diagnóstico de infecciones por *T. gondii*, los ensayos de avidéz de IgG específica constituyen la aproximación más adecuada junto con la seroconversión en muestras seriadas, con la ventaja de realizarse sobre una muestra única (Lappalainen y cols., 1993), y las infecciones por virus Hantaan se diagnostican de forma más eficaz con ensayos de avidéz, considerando que la mayoría de pacientes con nefropatía epidémica muestran títulos altos y estables en los primeros días de la enfermedad (Hedman y cols., 1991). En lo que se refiere al VEB, este tipo de ensayo ha sido aplicado a la diferenciación de la infección primaria y secundaria en pacientes transplantados (Gray y Wreghitt, 1989).

Al aplicar los ensayos de avidéz de IgG frente a VCA al diagnóstico de síndromes mononucleósicos infantiles, se

obtiene evidencia de presencia de IgG específica de baja avidéz en el 94,7% de las muestras de pacientes con infección reciente por el VEB estudiadas (**Tabla IV.9.**). El método ha mostrado ser tan sensible al menos como los procedimientos habituales, ya que se detecta resultado indicativo de primoinfección reciente en 89 casos, en comparación con los 87 positivos al ensayar IgM anti-VCA, y con los 85 que mostraban presencia de IgG anti-VCA en ausencia de anticuerpos frente a EBNA (**Tabla IV.9.**). El hecho de que todos los casos en que ha fallado este marcador se acumulen en niños menores de 6 años (**Figura IV.16.**) carece de significación.

Se ha obtenido IgG de baja avidéz en dos casos de los 27 estudiados (7,4%) (**Tabla IV.9.**) que mostraban perfiles serológicos indicativos de infección pasada por el virus (presencia de IgG anti-VCA y de anticuerpos frente a EBNA, en ausencia de IgM anti-VCA). Si a estos 27 casos estudiados se añaden los 30 casos que eran negativos al VEB se obtiene una especificidad real del método en su aplicación al diagnóstico de la MI del 96,5% (**Tabla IV.11.**). Considerando que los criterios usados para la clasificación de casos de infección reciente por el VEB pueden fallar en algunos (entre el 6,9% y el 8,9% en el presente estudio), no se puede excluir de forma concluyente que estos dos sean en realidad casos de infección reciente por el virus, en los cuales han fallado ambos criterios, especialmente la muestra 2338 (**Tabla IV.10.**) que fue tomada

a los 90 días del comienzo de la enfermedad, por lo que se trataría, en realidad, de una muestra tardía de una infección primaria por el virus.

No se observa relación entre el tiempo de evolución de las muestras con el fallo en el ensayo de avidez de IgG anti-VCA (**Figura IV.17.**). De hecho, no se conoce con exactitud el tiempo necesario para la maduración de IgG específica. Un estudio realizado para establecer la duración de IgG₁ anti-rubéola, en el que se utiliza dietilamina como agente desnaturizante, encuentra IgG₁ de baja avidez en el 91% de las muestras tomadas entre 3 y 4 meses del comienzo de la enfermedad, y en el 21% en las tomadas entre 5 y 7 meses (Thomas y cols., 1992). De cualquier forma, se requieren estudios adicionales que permitan establecer la especificidad del ensayo, y la duración de los anticuerpos de baja avidez.

Otra aproximación a la serología de las infecciones por VEB lo constituye la utilización de péptidos sintéticos que reproducen antígenos con aplicación diagnóstica. Hennessy y cols. (1983a, 1983b) identificaron el segmento de ADN que codifica para la proteína EBNA-1. Describieron la IR3, región del ADN que codifica sólo residuos de glicina y alanina. Se han desarrollado péptidos que representan esta región, observándose que uno de ellos, el p62, era altamente específico al ensayar sueros humanos (Rhodes y cols., 1985), y que induce anticuerpos reactivos

frente a EBNA-1 cuando se inocula en conejos (Dillner y cols., 1984). Aunque los anticuerpos anti-EBNA, detectados por IFAC emergen tardíamente (Henle y cols., 1974), se ha demostrado en sueros agudos de pacientes de MI respuesta IgM frente a p62: Smith y cols. (1986), encontraron que 11 de 13 pacientes con mononucleosis por VEB mostraban reactividad IgM frente a p62.

Con la utilización del ensayo que diferencia respuestas IgG e IgM frente al péptido sintético p62 se ha logrado resultado positivo en el 70,3% de muestras procedentes de enfermos con infección reciente por el VEB (Tabla IV.20.), proporción de positivos comparable a la obtenida al ensayar AH (66,3%) (Tabla IV.19.). Sin embargo, en muestras de niños menores de 5 años, el rendimiento de este procedimiento es significativamente mayor que la detección de AH (61,5% frente al 39,6%) (Tabla IV.21. y Figura IV.21.). A partir de estas edades, las dos aproximaciones muestran rendimientos similares.

Otros estudios refieren valores de sensibilidad superiores al 90%, con el mismo ensayo (Levin y cols., 1991; Gray y cols., 1992), o utilizando el mismo péptido en un ensayo en microplaca (Linde y cols., 1990). Las diferencias en sensibilidad con respecto a las obtenidas en el presente estudio son atribuibles probablemente a diferencias en la selección de las muestras.

Con el objeto de valorar la especificidad del ensayo se ensayaron muestras de donantes de sangre, y de mujeres embarazadas. Todas estas últimas resultaron negativas, en tanto que se obtuvo resultado positivo en 3 de los 20 donantes de sangre. Para excluir que realmente existiera una infección reciente por el VEB, se ensayaron estas muestras para marcadores de infección por el VEB (presencia de IgM anti-VCA, presencia de IgG anti-VCA en ausencia de anticuerpos anti-EBNA, y AH), resultando ser negativas a todos ellos.

Otro importante aspecto a considerar en la valoración de un marcador en su aplicación al diagnóstico de infecciones por VEB es el diagnóstico diferencial de otros virus capaces de producir también síndromes mononucleósicos. Se ensayaron sueros procedentes de infecciones por CMV y de rubéola, obteniéndose resultado positivo en el ensayo p62 en 4 de 11 casos por CMV, y en ninguno de los casos de rubéola (Tabla IV.19.). Ninguno de los 4 casos mostró ningún marcador de infección reciente por el VEB. Existen estudios previos en los que se refiere falta de especificidad del ensayo: Matheson y cols. (1990) obtienen resultados positivos falsos en casos de infección por adenovirus, CMV, y *T. gondii*; y Gray y cols. (1992) en pacientes con infección por CMV, así como en muestras que contienen FR, aunque otro estudio refiere una tasa de resultados positivos en pacientes con CMV sólo del 3%, en comparación con el 12% de casos con reactividad IgM anti-

VCA (Linde y cols., 1990).

Así pues, el ensayo de ELISA que utiliza el antígeno p62, resulta adecuado para el diagnóstico de la MI en niños menores de 5 años, en sustitución de la detección de AH. Sin embargo, considerando la sensibilidad del ensayo, así como los resultados positivos obtenidos en infecciones por otros patógenos, no debe ser empleado en sustitución de los marcadores serológicos específicos.

La última aproximación ensayada para el diagnóstico serológico de las infecciones por VEB es la utilización de proteínas recombinantes como antígeno para técnicas de ELISA. Se emplean tres antígenos recombinantes, que representan a proteínas del componente difuso de EA (proteínas p/54 y la proteína de fusión p/138), así como la proteína p/72, del antígeno EBNA-1. La proteína p/54 está relacionada con una ADN polimerasa de VEB (Li y cols., 1987), en tanto que la p/138 no se expresa en las células Raji inducidas químicamente, que es como se usan habitualmente para la detección de anticuerpos frente a EA, aunque sí en tal línea sobreinfectada con VEB procedente de la línea P3HR1 (Angel y cols., 1987). Por último, la proteína p/72 de EBNA-1 presenta la ventaja de no incluir el copolímero de glicina y alanina, lo que, en teoría, le proporciona mayor especificidad, ya que se ha reconocido a este copolímero como el responsable de reactividad heteróloga con autoanticuerpos en sueros de pacientes con

MI (Rhodes y cols., 1987; Venables y cols., 1988).

El uso combinado de los tres marcadores utilizados (IgG e IgM contra las proteínas p/54 y p/138, así como IgG contra la proteína p/72) permitió la correcta caracterización del 87,8% de los casos de infección primaria estudiados. Sin embargo, los ensayos no están libres de problemas. Por una parte, sólo en 6 de los 8 casos con marcadores de infección pasada según los criterios de referencia se obtuvo un perfil indicativo de infección pasada. Por otro lado, en parte de los casos de infección por CMV y VHH-6, se obtuvieron perfiles de infección primaria por el VEB, lo que se interpreta como una importante reacción cruzada entre los tres virus, cuando se emplea este sistema de ELISA utilizando antígenos recombinantes. Esta aparente falta de especificidad de los ensayos contrasta con los resultados de un estudio previo, que el que se encuentra que son altamente específicos, empleando sueros de donantes de sangre (Gorgievski-Hrisoho y cols., 1990).

Una complicación adicional que supone el uso de tales ensayos es que, a partir de cuatro perfiles de referencia que definen dos situaciones (infección reciente o pasada) se obtienen ocho perfiles (**Tabla IV.22.**) que definen cuatro situaciones (infección primaria, reactivación aguda, infección previa y ausencia de infección) (**Tabla IV.23.**). Como es obvio, el uso de tales ensayos en laboratorios de

diagnóstico clínico sería complejo por las dificultades de interpretación, por lo que su uso, con las limitaciones citadas, debería restringirse a laboratorios altamente especializados.

V.4. REACCIONES HETEROLOGAS ENTRE VEB, CMV Y VHH-6 EN SINDROMES MONONUCLEOSICOS

La reactividad heteróloga entre los virus constituye una importante fuente de problemas para la correcta identificación etiológica de determinadas infecciones. La causa más inmediata para la obtención de reactividad IgM heteróloga es la presencia simultánea en la muestra de IgG frente a otros virus y FR, que es una IgM con especificidad de IgG humana, de frecuente aparición en las infecciones víricas. Cuando se dan estas condiciones, y se utilizan metodologías en fase sólida, el antígeno inmovilizado captura el complejo IgG - FR a través de la IgG específica. Esta IgG es erróneamente identificada como IgM al añadir el conjugado anti-IgM, que se une al FR (Meurman, 1983). Este problema, que se puede considerar técnico, es independiente del virus y del huésped, y se resuelve fácilmente, purificando la IgM en la muestra.

Las respuestas IgM positivas múltiples inducidas directamente por el virus que produce la infección, o por la propia patogenia de la infección, se deben a varias posibles causas. Primera, que la primoinfección por un

virus participe en la reactivación de otro que se mantiene en estado latente. Este hecho es especialmente importante para los virus de la familia *Herpesviridae*, que al primoinfectar establecen una infección latente en el huésped. Segunda, que la reactividad heteróloga sea fruto de la estimulación policlonal de linfocitos B de memoria, situación que se produce en los síndromes mononucleósicos. Tercera, que la reacción heteróloga corresponda a reactividad cruzada entre virus, particularmente, cuando los virus que muestran reacción cruzada son capaces de producir la misma enfermedad, caso de la MI y los VEB, CMV, y VHH-6. No se puede excluir, cuarta, que una múltiple reacción IgM específica responda en realidad a varias infecciones simultáneas.

En el presente estudio se han obtenido dos casos con evidencia serológica de infección primaria doble por VEB y CMV. Los casos 647/9 y 1792/8 (**Tabla IV.17.**) inicialmente fueron caracterizados como infección reciente por el VEB, y mostraban IgM anti-CMV, tanto por ELISA indirecto como por el de captura anti- μ . Fueron finalmente clasificados como infección doble, después de considerar los resultados del ensayo de avidéz de IgG frente a CMV. Considerando que la infección por los tres virus en los primeros años de la vida es muy frecuente, no es del todo extraño que se produzcan infecciones simultáneas, o muy cercanas en el tiempo.

Por otra parte, se han obtenido reacciones heterólogas al estudiar IgM anti-CMV por captura anti- μ en 29 de los 99 pacientes con infección por el VEB (29,3%), de los que 15 fueron también positivos por ELISA indirecto (**Tabla IV.17.**).

De los 29 casos por VEB que mostraban IgM anti-CMV, 11 eran seronegativos a CMV (**Tabla IV.17.**). Todos tenían IgM anti-VCA, IgG anti-VCA, siendo negativos para anticuerpos anti-EBNA, e IgG anti-VCA de baja avidéz. El hecho de que fueran positivos para IgM anti-CMV siendo seronegativos para CMV tiene dos posibles explicaciones: que se trate de una infección doble, con una respuesta IgM anti-CMV específica muy temprana, o que se trate de reacción cruzada. La primera posibilidad es altamente improbable, considerando el tiempo de evolución de las muestras (siete de ellas tenían más de 5 días desde el comienzo de la enfermedad, tiempo suficiente para ser detectable una respuesta IgG positiva por un método sensible). Así pues, la explicación más plausible es que se trate de una reacción cruzada pura entre VEB y CMV.

Los 18 casos restantes de infección por VEB con IgM anti-CMV eran seropositivos a CMV (**Tabla IV.17.**). Diecisiete mostraban IgM anti-VCA, otros 17 presencia de IgG anti-VCA en ausencia de anticuerpos anti-EBNA, y todos los estudiados en el ensayo de avidéz de IgG anti-VCA (14 casos) tenían IgG anti-VCA de baja avidéz. Los 18 casos

mostraron al menos dos de los tres marcadores de infección por VEB. En dieciséis casos se pudo realizar determinación de la avidéz de IgG anti-CMV; todos ellos resultaron tener IgG de alta avidéz; indicando una infección pasada por CMV. En este grupo de muestras existen tres posibilidades: que se trate de reacción cruzada, que se trate de una reactivación del CMV latente como consecuencia de la primoinfección por el VEB, o que se trate de una estimulación policlonal de linfocitos B de memoria, como un fenómeno patogénico de la infección por el VEB. Considerando que ninguna de estas muestras fue positiva cuando se determinó IgM frente a rubéola, estando todos los pacientes presumiblemente vacunados con la vacuna triple vírica, la posibilidad de que la reactividad heteróloga responda a una estimulación policlonal de linfocitos B es improbable. Así pues, la reactividad IgM anti-CMV en estos pacientes seropositivos a CMV se puede deber bien a la reactivación del CMV latente, como consecuencia de la primoinfección por el VEB, o, como sucedía en los pacientes seronegativos a CMV, a una reacción cruzada entre ambos virus.

Es especialmente llamativa la obtención de un resultado IgM anti-CMV positivo en un caso (915/8, **Tabla IV.17.**) que no mostró IgM anti-VCA por IFI, y que fue caracterizado como infección reciente por el VEB por mostrar presencia de IgG anti-VCA en ausencia de anticuerpos anti-EBNA, e IgG anti-VCA de baja avidéz.

Parece posible que existan casos de infección primaria por VEB que cursen sin IgM frente a VCA, y que muestren reacción heteróloga IgM frente a CMV.

Se ha descrito reactividad heteróloga entre VEB y CMV utilizando diferentes metodologías. Se ha detectado IgM anti-CMV en pacientes con infección por VEB por IFI (Hekker y cols., 1979), ELISA indirecto (Krishna y cols., 1980; de Ory y cols., 1988a), radioinmunoensayo (Kangro y cols., 1980), y por ELISA de captura anti- μ utilizando antígeno marcado (de Ory y cols., 1988a). La reacción contraria es más controvertida, aunque parece ser menos intensa. Utilizando ensayos de captura anti- μ , Schmitz (1982) no encuentra ningún caso IgM positivo a VEB de 42 pacientes con infección por CMV; Wielaard y cols. (1988) detectan reactividad IgM frente a VEB en 1 de 28 pacientes con infección por CMV, y de Ory y cols. (1988b) encuentran como positivos 3 de 7 casos estudiados. Por otra parte, utilizando métodos indirectos, de ELISA e inmunofluorescencia, de Ory y Echevarría (1989) encuentran un caso positivo en cada ensayo, al estudiar 9 muestras.

Por otra parte, ninguna de las muestras inicialmente caracterizadas como procedentes de infección por CMV mostró IgM frente a VEB. Por tanto, con las reservas derivadas del escaso número de casos de mononucleosis por CMV ensayados, pero que corresponden a la incidencia relativa real en población infantil, se puede considerar que la reacción

cruzada entre los VEB y CMV es fundamentalmente unidireccional.

En lo que se refiere a las reacciones entre VHH-6 y los otros dos virus, no se ha detectado reactividad heteróloga al medir IgM específica, entre aquél y el VEB. En cambio, al estudiar IgM anti-VHH-6 en las muestras de pacientes con infección por CMV, se ha encontrado resultado positivo en una muestra, de un niño de dos años, tomada dos días después del comienzo de la enfermedad (muestra número 1010/8, **Tabla IV.18.**). La muestra fue caracterizada como correspondiente a una infección por CMV por presentar IgM anti-CMV detectada por ELISA indirecto y de captura anti- μ , e IgG anti-CMV de baja avidéz. Se excluyó que se tratara de una primoinfección por VHH-6 considerando el resultado negativo obtenido en el ensayo de avidéz de IgG frente a VHH-6. Además, otra muestra del mismo paciente, tomada 28 días más tarde (1472/8, **Tabla IV.18.**) mostraba resultado IgM anti-CMV positivo, aunque más bajo, por ambos ensayos, e IgG de baja avidéz frente a CMV, en tanto que ya no era detectable la reactividad IgM anti-VHH-6.

Estudios previos han referido reactividad heteróloga entre VHH-6 y CMV en transplantados renales y cardíacos que sufrían infección por CMV, reflejados tanto en seroconversiones o aumentos del título de anticuerpos, como en la detección de IgM específica (Irving y cols., 1988). Por otra parte, Larcher y cols., (1988) refieren la

reactividad heteróloga entre CMV y VHH-6 en un paciente con una reactivación por CMV. Estos autores no encuentran ninguna reactividad cruzada entre VHH-6 y VHS, VVZ, rubéola, parotiditis y sarampión. En un estudio más completo, Morris y cols. (1988) ensayan sueros de pacientes con infección por VEB (1 caso), VHS (3 casos), VVZ (5 casos) y CMV (10 casos), encontrando variaciones significativas en el título de anticuerpos en 2 de los casos de VVZ y en 9 de los producidos por CMV. Irving y cols. (1989) estudian reactividad IgM anti-VHH-6 en casos de infección por CMV y VEB, encontrando resultado positivo en 4 de 25 casos por VEB (16%) y en 6 de 25 casos por CMV (24%). Igualmente, detectan variaciones significativas en los títulos de IgG anti-VHH-6 en pacientes con seroconversión a CMV. Con el ánimo de dilucidar si tales seroconversiones responden a reacción cruzada o son auténticas, realizan ensayos de adsorción cruzada con los dos virus. Encuentran que la eliminación de IgG anti-CMV no tiene efecto en los títulos de IgG anti-VHH-6, lo que significa que la variación en el título frente a VHH-6 no es exclusivamente fruto de reacción cruzada entre los dos virus. Al contrario, la eliminación de IgG anti-VHH-6 se manifiesta en reducción en el título de IgG anti-CMV en uno de cinco casos. Estos autores sugieren que puede existir en algunos casos una reactividad cruzada unidireccional entre los dos virus.

Aparte de la reactividad entre los virus del grupo

herpes en casos de MI se ha descrito reactividad frente a rubéola (Morgan-Capner y cols., 1983), y frente a rubéola y *T. gondii* (de Ory y cols., 1988), aunque en el presente estudio no se han identificado casos con marcadores serológicos de infección reciente por rubéola.

En definitiva, muy frecuentemente se detecta reactividad heteróloga a CMV en pacientes por VEB, y a VHH-6 en pacientes por CMV, cuando se ensaya el marcador más utilizado para el diagnóstico serológico de infección vírica (la detección de IgM específica) (**Figura IV.20.**). En casos concretos, tal reactividad puede conducir a errores en la caracterización etiológica en síndromes mononucleósicos, por lo que se precisan ensayos alternativos a la detección de IgM específica.

V.5. RELACION DEL VEB EN LA PRODUCCION DE NEUMONIA INTERSTICIAL LINFOIDE EN NIÑOS VIH POSITIVOS

Como ya se ha comentado previamente, la MI es un síndrome linfoproliferativo autolimitado. El virus inmortaliza linfocitos B, permaneciendo en este tipo celular en estado latente. Con frecuencia se produce la reactivación del virus, produciéndose excreción asintomática. Este esquema patogénico es el que se produce cuando la infección tiene lugar en un individuo inmunocompetente. Por otra parte, cuando la infección se produce en un individuo inmunodeprimido, o bien un

individuo infectado por el virus en el pasado deviene en un estado de inmunodepresión, las reactivaciones son más frecuentes, pudiendo ir acompañadas de manifestaciones clínicas. En los últimos años se ha incrementado el número de casos de pacientes inmunodeprimidos, fundamentalmente debido al incremento en el número de pacientes en programa de transplante, y al aumento de la prevalencia de la infección por el VIH.

En concreto, el número de casos pediátricos de VIH se ha visto incrementado de forma importante en nuestro país, debido al aumento de mujeres en edad fértil infectadas por el virus. Se ha estimado que la tasa de transmisión vertical se encuentra entre el 12% y el 30% (Blanche y cols., 1989; The European Collaborative Study, 1991). No hay, sin embargo, conocimiento de los diferentes cofactores que influyen en la transmisión vertical o en el desarrollo de la enfermedad en estos niños. Se ha especulado que la infección simultánea del VIH y otros virus (VEB, VHS, CMV, hepatitis B y C) puedan jugar un papel importante. Dado que se ha encontrado que un gen temprano inmediato del VEB puede incrementar el nivel de expresión del VIH (Kenney y cols., 1988), y que el VEB produce una infección que afecta tanto a linfocitos como a células epiteliales, se ha planteado que puede ser de gran importancia en el desarrollo de la enfermedad por VIH.

Entre las complicaciones del SIDA que se han

relacionado con el VEB figuran como principales los linfomas no-Hodgkin, y la neumonía intersticial linfoide; en tanto que los primeros se producen en adultos, la segunda principalmente afecta a niños nacidos de madres seropositivas. El desarrollo de la neumonía intersticial linfoide comienza alrededor de los dos años de vida, y, en general, los afectados de esta linfoproliferación tienen mejor pronóstico que aquéllos no afectados, que se ven más frecuentemente afectados de infecciones oportunistas. Al estudiar niños con SIDA y con el complejo relacionado con SIDA, Rubinstein y cols. (1986) encuentran evidencia de infección persistente por VEB exclusivamente en los pacientes con neumonía intersticial linfoide: detectan ADN de VEB en cuatro de cinco especímenes de pulmón de pacientes con hiperplasia linfoide pulmonar, y no en los pacientes con neumonía por *Pneumocystis carinii*; además los títulos de IgG, IgA e IgM anti-VCA fueron mayores en los pacientes con la hiperplasia linfoide pulmonar. Katz y cols. (1992) han referido recientemente la evidencia serológica de infección activa por VEB en diez niños con SIDA, que presentaban síndromes linfoproliferativos, de los que siete eran neumonía intersticial linfoide, encontrando perfiles de infección, bien primaria o recurrente, en todos los casos estudiados, a diferencia de los controles, en los que sólo detectaron tal evidencia en 2 de 13 casos (15%).

En el presente estudio, se han estudiado muestras de 11 pacientes, de los que 5 estaban en la fase clínica P2AC,

y los 6 restantes en la fase P2AD2. Los cinco primeros desarrollaron la NIL a los dos años, y comenzaron a ser estudiados a los tres años. En todos ellos se obtuvieron patrones serológicos atípicos (Tabla IV.24.), ya que se obtienen negativizaciones de los anticuerpos anti-EBNA en individuos previamente positivos (casos 1, 3 y, probablemente, 4), IgM anti-VCA que duran al menos tres años (casos 2 y 5), títulos muy altos, superiores o iguales a 1/160, de IgG frente a EA (casos 3, 4, y 5).

Por otra parte, los casos de estadio P2AD2 (Tabla IV.25.) no mostraron títulos altos frente a EA ni presencia de IgM anti-VCA, aunque sí en tres de ellos se observó negativización de anticuerpos frente a EBNA.

Se ha planteado que defectos en la respuesta T citotóxica en los individuos que presentan inmunodepresión natural o inducida pueden conducir a niveles muy bajos o indetectables frente a EBNA (Masuci y cols., 1981; Vilmer y cols., 1984). En este estudio, en ambos grupos de pacientes se observan negativizaciones de los anticuerpos frente a EBNA; este hallazgo es compatible con una respuesta de anticuerpos baja en estos niños, que hace posible que en pocos años caigan a niveles indetectables los anticuerpos frente a EBNA. Por otra parte, la existencia de títulos altos frente al antígeno temprano en los niños que están en la fase clínica P2AC, a diferencia de los que están en la P2AD, es compatible con replicación

activa del virus. De cualquier forma, la serología frente a VEB en una única muestra de suero en los pacientes con infección congénita por VIH debe ser manejada con precaución, considerando que los defectos en la respuesta de anticuerpos que se producen en estos pacientes pueden conducir a interpretaciones diagnósticas erróneas.

VI. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en el presente estudio, de acuerdo con los objetivos planteados, son las siguientes:

PRIMERA. De los valores de seroprevalencia obtenidos tanto en donantes como en mujeres embarazadas se concluye que los tres virus son de amplia distribución. Se observan diferencias en la seroprevalencia a los tres virus en mujeres embarazadas, de forma que la infección por VEB aparece como la más frecuente, y la producida por CMV como la menos.

SEGUNDA. En las muestras de niños menores de dos meses se observan valores de seroprevalencia frente CMV similares a los obtenidos en mujeres embarazadas. Por otra parte, en este mismo grupo de edad, al estudiar anticuerpos frente a VEB, y en los menores de tres meses, al estudiarlos frente a VHH-6, los valores de seroprevalencia son significativamente menores que los obtenidos en mujeres embarazadas. Se puede concluir que los niveles de los anticuerpos transferidos por las madres son menores en los casos de VHH-6 y VEB que en el de CMV.

TERCERA. A partir de los 4, 9 y 10 meses se observa un aumento en la seroprevalencia frente a VHH-6, VEB y CMV, respectivamente, indicándose que se producen infecciones a partir de esas edades. En función de la propia capacidad de los virus de producir síndromes mononucleósicos, cabe esperar que se produzcan estos síndromes a partir de edades

muy tempranas.

CUARTA. Se confirma que el VEB es el primero en importancia como responsable de síndromes mononucleósicos en la infancia. Los otros dos virus producen también un número importante de casos, por lo que en aquellos casos negativos al VEB deben ser estudiados marcadores de infección por CMV y VHH-6. Aún así queda un importante número de casos sin diagnosticar. El VHH-6 es una causa importante en la producción de síndromes mononucleósicos en niños muy pequeños.

QUINTA. El uso simultáneo de dos marcadores serológicos específicos de infección por VEB (presencia de IgM anti-VCA, y presencia de IgG anti-VCA en ausencia de anticuerpos anti-EBNA) aumenta el rendimiento de la identificación etiológica de los casos de MI. En niños de 1 y 2 años la presencia de IgG anti-VCA en ausencia de anticuerpos anti-EBNA parece más eficaz que la detección de IgM anti-VCA. En el resto de edades es más eficaz este segundo marcador. La cuantificación de IgG anti-VCA no tiene ningún valor como marcador de infección reciente. Sucede lo mismo con las valoraciones cualitativa y cuantitativa de IgG anti-EA. En lo que se refiere a la determinación cualitativa de AH por métodos rápidos de aglutinación en porta, se confirma que no es un marcador aplicable en niños menores de 8 años.

SEXTA. La aplicación del método de ELISA que utiliza un

péptido sintético muestra mejorar el rendimiento diagnóstico que ofrece la detección de AH en niños pequeños. No obstante, es menos sensible que los procedimientos serológicos específicos habituales, y es poco específico al estudiar muestras de pacientes con infección por CMV. Por otra parte, el uso de antígenos recombinantes no está indicado considerando la baja especificidad de los ensayos, así como la complejidad en la interpretación de resultados.

SÉPTIMA. La caracterización de la avidez de IgG específica es un marcador de infección primaria aplicable al diagnóstico de MI producida por los tres virus. En el caso del VEB mejora el rendimiento diagnóstico tanto de la detección de IgM anti-VCA como de la de IgG anti-VCA en ausencia de anticuerpos anti-EBNA.

OCTAVA. Son frecuentes las reacciones heterólogas entre VEB y CMV, y, probablemente, entre CMV y VHH-6. En algunos casos se confirma que la reactividad entre VEB y CMV es debida a reacción cruzada entre ambos, mientras que en otros se puede deber a estimulación policlonal de linfocitos B de memoria, a reactivaciones del virus heterólogo, o a infección doble. De cualquier forma los ensayos de avidez de IgG frente a los tres virus son aplicables al diagnóstico diferencial.

NOVENA. Se confirma serológicamente la relación entre la

infección por VEB y el desarrollo de síndromes linfoproliferativos (neumonía intersticial linfoide) en niños VIH positivos. La pérdida de anticuerpos anti-EBNA se da tanto en el grupo de niños que desarrollan la neumonía como en el de los que no, probablemente debido a una respuesta deficiente de linfocitos T citotóxicos. Aquéllos que además muestran el síndrome linfoproliferativo presentan serología específica indicativa de replicación activa del virus.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Andersson, J., Ernberg, I. 1988. Management of Epstein-Barr virus infections. *Am. J. Med.* 85 (supl 2A): 107-115.

Angel, F., Decaussin, G., Daillie, J., Ooka, T. 1987. Comparison of early polypeptides induced in EBV producer and non-producer lymphoid cell lines. *Ann. Inst. Pasteur/Virol.* 138:169-181.

Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P.J., Gibson, T.G., Haltull, G. Hudson, G.S., Satchwell, S.C., Seguin, C., Tuffnell, P.S., Barrell, B.G. 1984. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 310:207-211.

Barranco, M., Vidal, J., Plans, P., Pumarola, T., Jiménez de Anta, M. T., Salleras, L. 1990. Seroepidemiología de la infección por virus de Epstein-Barr en Cataluña. *Actas del II Congreso Nacional de Virología (comunicación 144).* Valladolid.

Bartley, D.C., del Río, C., Shulman, J.A. 1987. Clinical complications. En: Schlossberg, D. (ed.): *Infectious mononucleosis (2ª ed.)* Springer Verlag, Nueva York.

Begovac, J., Soldo, I., Presecki, V. 1988. Cytomegalovirus mononucleosis in children compared with the infection in adults and with Epstein-Barr virus mononucleosis. *J. Infect.* 17:121-125.

Bertram, G. Dreiner, N., Krueger, G.R.F., Ablashi, D.V., Salahuddin, S.Z. 1988. Serological correlation of HHV-6 and EBV infections in infectious mononucleosis. En: Ablashi, D.V., Faggioni, A., Krueger, G.R.F., Pagano, J.S., Pearson, G.R. (eds.): *Epstein-Barr virus and human disease 1988.* Humana Press. Clifton, New Jersey, EEUU.

Biberfeld, P., Petrén, A. L., Eklund, A., Lindeman, C., Barkhem, T., Ekman, M., Ablashi, D., Salahuddin, Z. 1988. Human herpesvirus-6 (HHV-6, HBLV) in sarcoidosis and lymphoproliferative disorders. *J. Virol. Methods* 21:49-59.

Biggar, R.J., Henle, G., Bocker, J., Lennette, E.T., Fleisher, G., Henle, W. 1978. Primary Epstein-Barr virus infections in African infants. II. Clinical and serological observations during seroconversion. *Int. J. Cancer* 22: 244-250.

Blackburn, N.K., Besselaar, T.G., Schoub, B.D., O'Connell, K.F. 1991. Differentiation of primary cytomegalovirus infection from reactivation using the urea denaturation test for measuring antibody avidity. *J. Med. Virol.* 33:6-9.

Blanche, S., Rouzioux, C., Guihard Moscato, M.L., Veber, F., Mayaux, M.J., Jacomet, C., Tricoire, J., Deville, A., Vial, M., Firtion, G., deCrepay, A., Douard, D., Robin, M., Courpottin, C., Ciraru-Vigneron, N., leDeise, F., Griscelli,

C., and the HIV infection in newborns french collaborative study group. 1989. A prospective study in infants born to women seropositive for human immunodeficiency virus type 1. N. Eng. J. Med. 320:1643-1648.

Briggs, M., Fox, J., Tedder, R.S. 1988. Age prevalence of antibody to human herpesvirus 6. Lancet i:1058-1059.

Brown, N.A., Sumaya, C.V., Liu, C.R., Ench, Y., Kovacs, A., Coronese, M., Kaplan, M.H. 1988. Fall in human herpesvirus 6 seropositivity with age. Lancet ii:396.

Bujía, J., Wilmes, E., Wolf, H., Bartual, J. 1992. Presencia del virus Epstein-Barr en el anillo linfático de Waldeyer durante la fase aguda de la mononucleosis infecciosa. Acta Otorrinolaringol. Esp. 43:93-96.

Centers for Disease Control. 1987. Classification system for human immunodeficiency virus (HIV) infection in children under 13 years of age. MMWR 36:225-236.

Civeira, M.P., Cuende, I., Castilla, A., Prieto, J. 1989. Prevalencia de anticuerpos frente al virus herpes humano 6 (VHH-6 o HBLV) en la población general. Med. Clín. (Barc.) 92:199.

Cohen, J.I. 1993. Molecular biology of Epstein-Barr virus and its mechanism of B-cell transformation. En: Strauss, S.E. (mod.): Epstein-Barr virus infections: biology, pathogenesis and management. Ann. Intern. Med. 118:45-58.

Cour, M.I., Giménez, A., Martínez, J.A., González Cuadrado, S., González Gómez, C., Martín, C.F., Fernández, M.E., Arroyo, R. 1991. Prevalencia del virus de Epstein-Barr en diferentes poblaciones de la zona centro. An. Med. Int. (Madrid) 8:529-532.

Cour M.I., López-Bartolomé, O., Ortega, P., Rejas M., Cuevas, L., Ferro, A., Fernández Contreras, E. 1988. Citomegalovirus: un estudio en 4977 mujeres gestantes y no gestantes. Med. Clín. (Barc.) 90:225-228.

Cuillard, M., Joly, J.R., Deschenes, L., Richer, G. 1992. Evaluation of variables in immunofluorescence procedures for the detection of antibodies against human herpesvirus 6. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 15:313-320.

Dahl, H., Linde, A., Sundquist, V., Wahren, B. 1990. An enzyme linked immunosorbent assay for IgG antibodies to human herpesvirus 6. J. Virol Methods 29:313-324.

Davidshon, I. 1938. Test for infectious mononucleosis. Am. J. Clin. Pathol. 8:56-60.

de Ory, F., Echevarría, J.M. 1989. Valoración de criterios serológicos para el diagnóstico de mononucleosis

- infecciosa. *Enf. Infec. Microbiol. Clin.* 7:485-488.
- de Ory, F., Fernández, M. V., Echevarría, J.M., Nájera, R. 1987. Anticuerpos frente a rubéola, sarampión y parotiditis en los dos primeros años de la vida. *Rev. Sanid. Hig. Pública* 61:289-300.
- de Ory, F., Pérez-Breña, P., Echevarría, J.M. 1988a. Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. *Serodiagn. Immunother. Infect. Dis.* 2:423-431.
- de Ory, F., Echevarría, J.M., León, P., Nájera, R. 1988b. Diagnóstico diferencial de mononucleosis infecciosa por virus Epstein-Barr y citomegalovirus mediante detección de IgM específica. *Enf. Infec. Microbiol. Clín* 6:19-23.
- de Ory, F., Echevarría, J.M. 1990. Rapid diagnosis of Epstein-Barr virus infections: comparison of two commercial methods. *Serodiagn. Immunother. Infect. Disease* 4:131-135.
- de Ory, F., Minguito, T., Bustillo, M. A., Echevarría, J. M. 1992. Aplicación del fluoroinmunoensayo a la identificación de IgG específica de baja avidez como marcador de infección reciente por virus de la rubéola. Comunicación al V Congreso de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Barcelona (póster 141).
- Dewhurst, S., McIntyre, K., Schanbel, K., Hall, C.B. 1993. Human herpesvirus-6 (HHV-6) variant B accounts for the majority of symptomatic primary HHV-6 infections in a population of U. S. infants. *J. Clin. Microbiol* 31:416-418.
- Dillner, J., Sternas, L., Kallin, B., Alexander, H., Ehlin-Henriksson, B., Jörvall, H., Klein, G., Lerner, R. 1984. Antibodies against a synthetic peptide identify the Epstein-Barr virus determined antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:4652-4656.
- Di Luca, D., Mirandola, P., Secchiero, P., Cermelli, C., Aleotti, A., Bovenzi, P., Portonalli, M., Cassai, E. 1992. Characterization of human herpesvirus-6 strains isolated from patients with exanthem subitum with or without cutaneous rash. *J. Infect Dis* 166:689.
- Downey, H., McKinlay, C.A. (1923). Acute lymphadenosis compared with acute lymphatic leukemia. *Arch. Intern. Med.* 32:82-112.
- Echevarría, J.M., Sáinz, C., Montón, J.L., Gonzalo, F., Crespo, E., Morales, E., Cortés, E., Taracena, B., Nájera, R. 1984. Anticuerpos antisarampión en los dos primeros años de la vida. *An. Esp. Pediatr.* 20: 847-853.

Epstein, M.A., Achong, B.G. 1977. Pathogenesis of infectious mononucleosis. *Lancet* ii:1270-1273.

Epstein, M.A., Morgan, A.J. 1983. Clinical consequences of Epstein-Barr virus infection and possible control by an anti-viral vaccine. *Clin. Exp. Immunol.* 53:257-271.

Eshel, G.M., Eyov, A., Lahat, E., Brauman, A. 1987. Alice in Wonderland syndrome, a manifestation of acute Epstein-Barr virus infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 6:68.

Evans, A.S. 1978. Infectious mononucleosis and related syndromes. *Am. J. Med. Sci.* 276:325-339.

Fingerroth, J.D., Fearon, J.J., Tedder, T.F., Strominger, J.L., Biro, P.A., Fearon, D.T. 1984. Epstein-Barr virus receptor of human B-lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:4510-4514.

Fleisher, G., Bolognese, R. 1982. Seroepidemiology of Epstein-Barr virus in pregnancy. *J. Infect. Dis.* 145:537-541.

Fleisher, G.R., Collins, M., Fager, S. 1983. Limitations of available tests for diagnosis of infectious mononucleosis. *J. Clin. Microbiol.* 17:619-624.

Fox, J., Briggs, M. Tedder, R.S. 1988. Antibody to human herpesvirus 6 in HIV-1 positive and negative homosexual men. *Lancet* ii:396-397.

Frenkel N, Schirmer EC, Wyatt LS, Katsafanas G, Roffman E, Danovich RM, June CH. 1990. Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:748-752.

Golden, H.D., Chang, R.S., Prescott, W., Simpson, E., Cooper, T.Y. 1973. Leukocyte transforming agent: prolonged excretion by patients with mononucleosis and excretion by normal individuals. *J. Infect. Dis.* 127:471-473.

Gorgievski-Hrisoho, M., Hinderer, W., Nebel-Schickel, H., Horn, J., Vornhagen, R., Sonneborn, H.H., Wolf, H., Siegl, G. 1990. Serodiagnosis of infectious mononucleosis by using recombinant Epstein-Barr virus antigens and enzyme linked immunosorbent assay technology. *J. Clin. Microbiol.* 28:2305-2311.

Gray, J.J., Wreghitt, T.G. 1989. Immunoglobulin G avidity in Epstein-Barr virus infections in organ transplant recipients. *Serodiagn. Immunother Infect. Disease* 3:389-383.

Gray, J.J., Caldwell, J., Sillis, M. 1992. The rapid serological diagnosis of infectious mononucleosis. *J. Infect.* 25:39-46.

- Griffiths, P.D., Berney, S.I., Argent, S., Heath, R.B. 1982. Antibody against viruses in maternal and cord sera: specific antibody is concentrated on the fetal side of the circulation. *J. Hyg. (Camb.)* 89:303-310.
- Grist, N.R., Bell, E.J., Follett, E.A.C., Urquhart, G.E.D. 1979. *Diagnostic Methods in Clinical Virology*. 3ª edición. Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1979.
- Grose, C. 1988. Neurologic complications of infectious mononucleosis. En: Schlossberg, D. (ed.): *Infectious mononucleosis* (2ª ed.) Springer Verlag, Nueva York.
- Halbert, S.P., Anken, M., Henle, W., Golubsatnikov, R. 1982. Detection of infectious mononucleosis heterophil antibody by a rapid, standardized enzyme linked immunosorbent assay procedure. *J. Clin Microbiol* 15:610-616.
- Hallee, T.J., Evans, A.S., Niederman, J.C., Brooks, C.M., Voegtly, J.H. 1974. Infectious mononucleosis at the United States Military Academy: A prospective study of a single class over four years. *Yale J. Biol. Med.* 3:182-195.
- Hedman, K., Rousseau, S.A. 1989. Measurement of avidity of specific IgG for verification of recent primary rubella. *J. Med. Virol.* 27:288-292.
- Hedman, K., Vaheri, A., Brummer-Korvenkontio, M. 1991. Rapid diagnosis of hantavirus disease with an IgG-avidity assay. *Lancet* 338:1353-1356.
- Hedman, K., Lappalainen, M., Söderlund, M., Hedman, L. 1993. Avidity of IgG in serodiagnosis of infectious diseases. *Rev. Med. Microbiol* 4:123-129.
- Hekker, A.C., Brand-Saathof B., Vis, J., Mijers, R.C. 1979. Indirect immunofluorescence test for detection of IgM antibodies to cytomegalovirus. *J. Infect. Dis.* 140: 596-600.
- Henle, G., Henle, W. 1966. Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J. Bacteriol.* 91:1248-1256.
- Henle, G., Henle, W. 1968. Relation of Burkitt's tumor associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59:94-101.
- Henle, G., Henle, W., Horwitz, C.A. 1974. Antibodies to Epstein-Barr virus associated nuclear antigen in infectious mononucleosis. *J. Infect. Dis.* 130:231-239.
- Hennessy, K., Kieff, E. 1983. One of two Epstein-Barr virus nuclear antigens contains a glycine-alanine copolymer domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:5665-5669.

Hennessy, K., Heller, M., van Santen, V., Kieff, E. 1983. Simple repeat array in Epstein-Barr virus DNA encodes part of the Epstein-Barr nuclear antigen. *Science* 220:1396-1398.

Hinderer, W., Nebel-Schickel, H., Sonneborn, H. H, Motz, M., Kühbeck, R., Wolf, H. 1988. Purification of four different recombinant EBV antigens synthesized in *E. coli* and their diagnostic application. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 7 (supl) 132.

Hinuma, Y. Konn, M., Yamaguchi, J., Wudarski, D. J., Blackeslee, J. R., Grace, J. T. 1967. Immunofluorescence and herpes type virus particles in the P3HR-1 Burkitt's lymphoma cell line. *J. Virol.* 1: 1045-1051.

Ho, M. (1991). *Cytomegalovirus. Biology and Infection.* (2^a ed.). Plenum Medical Book Company. Nueva York.

Hoffman, G., Lazarowitz, S. G., Hayward, S. D. (1980). Monoclonal antibody against a 250000 dalton glycoprotein of Epstein-barr virus identifies a membrane antigen and a neutralizing antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2979-2986.

Horwitz, C.A., Henle, W., Henle, G., Snover, D., Rudnick, H., Balfour, H.H., Mazur, M.H., Watson, R., Schwartz, B., Muller, N. 1985. Clinical and laboratory evaluation of cytomegalovirus induced mononucleosis in previously healthy individuals. Report of 82 cases. *Medicine* 65:124-134.

Irving, W.L., Cunningham, A.L., Keogh, A., Chapman, J.R. 1988. Antibody to both human herpesvirus 6 and cytomegalovirus. *Lancet* ii:630-631.

Irving, W.L., Ratnamohan, V.M., Hueston, L.C., Chapman, J.R., Cunningham, A.L. 1990. Dual antibody rises to cytomegalovirus and human herpesvirus type 6: frequency of occurrence in CMV infections and evidence for genuine reactivity to both viruses. *J. Infect. Dis.* 161:910-916.

Johnson, R. B., Libby, R. 1980. Separation of immunoglobulin M essentially free of IgG from serum for use in systems requiring assay of IgM-type antibodies without interference from rheumatoid factor. *J. Clin. Microbiol.* 12:451-454.

Juel-Jensen, B.E. (1992). Mononucleosis infecciosa: virus de Epstein-Barr. En: Weatherhall, D.J., Ledingham, J.G.G., Warrell, D.A. (eds.): *Oxford Tratado de Medicina Interna*, vol 1. Ed. Médica Panamericana, Barcelona.

Kangro, H.O. Evaluation of a radioimmunoassay for IgM class antibodies against cytomegalovirus. 1980. *Br. J. Exp. Pathol.* 61:512-520.

Kangro, H.O., Manzoor, S., Harper, D.R. 1991. Antibody

avidity following varicella-zoster virus infections. J. Med. Virol. 33:100-105.

Katz, B.Z., Berkman, A.B., Shapiro, E.D. 1992. Serologic evidence of active Epstein-Barr virus infection in Epstein-Barr virus associated lymphoproliferative disorders of children with acquired immunodeficiency syndrome. J. Pediatr. 120:228-232.

Kenney, S., Kamine, J., Markowitz, D., Fenrick, R., Pagano, J. 1988. An Epstein-Barr virus immediate-early gene product transactivates gene expression from the human immunodeficiency virus long terminal repeat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:1652-1656.

Kettering, J. D., Schmidt, N. J., Lennette, E. H. 1977. Improved glycine extracted complement fixing antigen for human cytomegalovirus. J. Clin Microbiol. 6:647-649.

Kikuta, H., Osato, T., Matsumoto, S. (1989). Sites of Epstein-Barr virus replication in acute and chronic active Epstein-Barr virus infections. Intervirology 30:346-350.

Kilpatrick BA, Huang ES. 1977. Human cytomegalovirus genome: partial denaturation map and organization of genome sequences. J. Virol. 24:261-276.

Klemola, E., Kääriäinen, L. 1965. Cytomegalovirus as a possible cause of a disease resembling infectious mononucleosis. Brit. Med. J. 2:1099-1102.

Klemola, E. von Essen, R., Henle, G., Henle, W. 1970. Infectious mononucleosis like disease with negative heterophil agglutination test. Clinical features in relation to Epstein-barr and cytomegalovirus and antibodies. J. Infect. Dis. 121:608-614.

Klemola E., Stenstrom R., von Essen, R. 1972. Pneumonia as a clinical manifestation of cytomegalovirus infection in previously healthy adults. Scand. J. Infect. Dis. 4:7-10.

Komaroff, A. L. 1988. Chronic fatigue syndromes: relationship to chronic viral infections. J. Virol. Methods 21:3-10.

Krech, U., Tobin, J. 1981. A collaborative study of cytomegalovirus antibodies in mothers and young children in 19 countries. Bull. World Health Organ. 59: 605-610.

Krishna, R.V., Meurman, O.H., Ziegler, T., Krech, U.H. 1980. Solid phase enzyme immunoassay for determination of antibodies to cytomegalovirus. J. Clin. Microbiol 12:46-51.

Kruger, G.R.F. 1988. Human herpesvirus-6 infection and disease. Lancet ii:518.

Kumar, A., Madden, D.L., Nankervis, G.A. 1984. Humoral and cell-mediated immune responses to herpesvirus antigens during pregnancy. A longitudinal study. *J. Clin. Immunol.* 4:12-17.

Lappalainen, M., Koskela, P., Koskiniemi, M., Ämmälä, P., Hiilesmaa, V., Teramo, K., Raivio, K. O., Remington, J. S., Hedman, K. 1993. Toxoplasmosis acquired during pregnancy: improved serodiagnosis based on avidity of immunoglobulin G. *J. Infect. Dis.* 167:691-697.

Larcher, C., Huemer, H.P., Margreiter, R., Dierich, M.P. 1988. Serological crossreaction of human herpesvirus-6 with cytomegalovirus. *Lancet* ii:963-964.

Lennon, J.L., Black, F.L. 1986. Maternally derived measles immunity in era of vaccine protected mothers. *J. Pediatr.* 108:671-676.

Levey, B.A., Lo, T.M., Caldwell, K.E. Fletcher, M.A. 1980. Latex test for serodiagnosis of infectious mononucleosis. *J. Clin. Microbiol.* 11:256-262.

Levin, M.J., Weinstein, M.P., Sumaya, C.V., Gooch, M., Osband, M., Rhodes, G., Ackley, A.M., Wren, C.G., Podgore, J.K. 1991. The rapid diagnosis of infectious mononucleosis using an ELISA that detects IgM antibody to a peptide component of Epstein-Barr virus nuclear antigen. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 14:287-291.

Li, J.S., Zhou, B.S., Dutchman, G.E., Grill, S.P., Tan, R.S., Cheng, Y.C. 1987. Association of Epstein-Barr virus early antigen diffuse component and virus specified DNA polymerase activity. *J. Virol.* 61:2947-2949.

Linde, A., Kallin, B., Dillner, J., Anderson, J., Jägdal, L., Lindvall, A., Wahren, B. 1990. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays with two synthetic peptides of Epstein-barr virus for diagnosis of infectious mononucleosis. *J. Infect. Dis.* 161:903-909.

Linde, A. 1992. Diagnosis and pathogenesis of infectious mononucleosis and other Epstein-Barr virus associated diseases *Rev. Med. Microbiol.* 3:43-51.

Lindquester, G.J., Pellett, P.E. 1991. Properties of the human herpesvirus 6 strain z29 genome: G+C content, length, and the presence of variable-length repeated terminal sequence elements. *Virology* 182:102-110.

Lopez, C., Pellet, P., Stewrat, J., Goldsmith, C., Sanderlin, K., Black, J., Warfield, D., Feorino, P. 1988. Characteristics of human herpesvirus-6. *J. Infect. Dis.* 157: 1271-1273.

Luka, J., Chase, R.C., Pearson, G.R. 1984. A sensitive

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) against the major EBV associated antigens. I. Correlation between ELISA and immunofluorescence titers using purified antigens. J. Immunol. Methods 67: 145-156.

Mackowiak, P.A., Haley, M.L., Marling-Cason, M., Tiemens, K.M., Luby, J.P. 1987. Effect of human sex hormones on cytomegalovirus growth and Fc receptor expression. J. Lab. Clin. Med. 110:427-432.

Mahoney, D.H., Fernbach, D.J. 1988. The hematologic response. En: Schlossberg, D. (ed.): Infectious mononucleosis (2^a ed.) Springer Verlag, Nueva York.

Masuci, M.G., Szigeti, R.S., Ernberg, I., Masuci, G., Klein, G., Chessels, J., Sieff, C., Lie, A., Glomstein, L., Businco, L., Henle, W., Pearson, G., Sakamoto, K., Purtillo, D.T. 1981. Cellular immune defects to Epstein-Barr virus-determined antigens in young males. Cancer Res. 41:4284-4291.

Matheson, B.A., Chisholm, S.M., Ho-Yen, D.O. 1990. Assessment of rapid ELISA test for detection of Epstein-Barr virus infection. J. Clin. Pathol. 43:691-693.

Matsuo, T., Heller, M., Petti, L., Oshiro, E., Kieff, E. 1984. Persistence of the entire EBV genome integrated into human lymphocyte DNA. Science 226:1322-1325.

Meurman, O. 1984. Detection of antiviral IgM antibodies and its problems. A review. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 104:101-131.

Miller, G. 1990. Epstein-Barr virus. Biology, pathogenesis, and medical aspects. En: Fields, B.N., Knipe, D.M. (eds): Virology (2^a ed.). Raven Press, Nueva York.

Milman, G., Hwang, E.S. 1987. Epstein-Barr virus nuclear antigen forms a complex that binds with high concentration dependence to a single DNA-binding site. J. Virol. 61:465-471.

Morgan-Capner, P., Tedder, R.S., Mace, J.E. 1983. Rubella specific IgM reactivity in sera from cases of infectious mononucleosis. J. Hyg. (Camb.) 90:407-413.

Morris, D.J., Littler, E., Jordan, D., Arrand, J.R. 1988. Antibody responses to human herpesvirus 6 and other herpesviruses. Lancet ii:1425-1426.

Morris, G.E., Coleman, R.M., Best, J.M., Benetato, B.B., Nahmias, A.J. 1985. Persistence of serum IgA antibodies to herpes simplex, varicella-zoster, cytomegalovirus, and rubella virus detected by enzyme-linked immunosorbent assays. J. Med. Virol. 16:343-349.

Niederman, J.C., Liu, C.R., Kaplan, M.H., Brown, N.A. 1988. Clinical and serological features of human herpesvirus-6 infection in three adults. *Lancet* ii:817-819.

Nielsen, S.,L. Ronholm, E., Sorensen, I., Jaeger, P., Andersen, H.K. 1987. Improvement of serological diagnosis of neonatal cytomegalovirus infection by simultaneously testing for specific immunoglobulins E and M by antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 25:1406-1410.

Nikoskelainen, J., Leikola, J., Klemola E. 1974. IgM antibodies specific for Epstein-Barr virus in infectious mononucleosis without heterophile antibodies. *B. M. J.* 2:72-75.

Parker, C.A., Weber, J.M. 1993. An enzyme linked immunosorbent assay for the detection of IgG and IgM antibodies to human herpesvirus type 6. *J. Virol. Methods* 41:265-276.

Paul, J.R., Bunnell, W.W. 1932. The presence of heterophile antibodies in infectious mononucleosis. *Am. J. Med. Sci.* 183:80-104.

Paya, C.V., Wald, A.D., Smith, T.F. 1987. Detection of cytomegalovirus infections in specimens other than urine by the shell vial assay and conventional tube cell cultures *J. Clin. Microbiol.* 25:755-757.

Penman, H.G. 1970. Fatal infectious mononucleosis: a critical review. *J. Clin. Pathol.* 23:765-771.

Pruksananonda, P., Breese Hall, C., Insel, R.A., McIntyre, K., Pellett P.E., Long, C.E., Schnabel K.C., Pincus, P.H., Stamey F.R., Dambaugh T.R., Stewart, J.A. 1992. Primary human herpesvirus 6 infection in young children. *N. Engl. J. Med.* 326:1445-1450.

Pumarola, A., Salleras, L., Vidal, J., Canela, J., Mas, J., Jiménez de Anta, M.T., Pumarola, T., Coll, J.J., de la Puente, M. L. 1989. Prevalencia de anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii*, virus de la rubéola, citomegalovirus y virus del herpes simple en mujeres embarazadas de Cataluña. *Enf. Infec. Microbiol. Clín.* 7:83-86.

Qualtiere, L.F., Chase, R., Vroman, B., Pearson, G.R. 1982. Identification of Epstein-Barr virus strain differences with monoclonal antibody to a membrane glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:616-620.

Ranger S., Patillaud, S., Denis, F., Himmich, A., Sangare, A., M'Boup, S., Itoua-N'Gaporo, A., Prince-David, M., Chout, R., Cevallos, R., Agut, H. 1991. Seroepidemiology of human herpesvirus-6 in pregnant women from different parts of the world. *J. Med. Virol.* 4:194-198.

Rhodes, G., Carson, D.A., Valbracht, J., Houghton, R., Vaughan, J.H. 1985. Human immune responses to synthetic peptides from the Epstein-Barr nuclear antigen. *J. Immunol.* 134:211-216.

Rhodes, G., Rumpold, H., Kurki, P., Pattrick, K.M., Carson, D.A., Vaughan, J.H. 1987. Autoantibodies in infectious mononucleosis have specificity for the glycine-alanine repeating region of the Epstein Barr virus nuclear antigen. *J. Exp. Med.* 165:1026-1040.

Rickinson, A.B., Yao, Q. Y., Wallace, L.E. 1985. The Epstein-Barr virus as a model of virus-host interactions. *Brit. Med. J.* 41:75-79.

Roizman, B. 1990. Herpesvirus group. En: Francki R.I.B, Fauquet, C.M., Knudson, D.L., Brown, F. (eds.): *Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Arch. Virol. (Sup 2).

Roizman, B. 1991. Herpesviridae: a brief introduction. En: Fields, BN, Knipe DM, Chanock RM, Hirsch MS, Melnick JL. Monath, TP, Roizman B (eds). *Fundamental Virology* (2^a ed.), Raven Press, Nueva York, 841-847.

Roizman, B., Carmichael, L.E., de The, G., Nahmias, A.J., Plowright, W., Rapp, F., Sheldrick, P., Takahashi, M., Wolf, K. 1981. Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature and taxonomy. *Intervirology* 16:201-217.

Rowe, D., Heston, L., Metlay, J., Miller, G. 1985. Identification and expression of a nuclear antigen from the genomic region of the Jijoye strain of EBV that is missing in its nonimmortalizing deletion mutant P3HR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7429-7433.

Rubinstein, A., Morecki, R., Silverman, B., Charytan, M., Krieger, B.Z., Andiman, W., Ziprkowski, M.N., Goldman, A. 1986. Pulmonary disease in children with acquired immune deficiency syndrome and AIDS related complex. *J. Pediatr.* 108:498-503.

Salahuddin, S.Z., Ablashi, D.V., Markham, P.D., Josephs, S. F., Sturzenegger, S., Kaplan, M., Halligan, G., Biberfeld, P., Wong-Staal, F., Kramarsky, B., Gallo, R.C. 1986. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 234:596-601.

Schmader K.E., van der Horst, C.M., Klotman, M.E. 1989. Epstein-Barr virus and the elderly host. *Rev. Infect. Dis.* 11:64-73.

Schmitz, H. 1982. Detection of Immunoglobulin M antibody to Epstein-Barr virus by use of an enzyme labelled antigen. *J. Clin. Microbiol.* 16:361-366.

Schooley, R.T., Dolin, R. 1990. Virus de Epstein-Barr (mononucleosis infecciosa). En: Mandell, G.L., Douglas, R.G., Bennett, J.E. (eds.): Enfermedades Infecciosas. Principios y práctica 3a edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.

Schoub, B.D., Blackburn, N.K., Johnson, S., McAnerney, J.M. Miller, B. 1992. Low antibody avidity in the elderly chickenpox patients. J. Med. Virol. 37:113-115.

Sixbey, J.W., Davis, D.S., Young, L.S., Hurt-Fletcher, L., Tedder, T.F., Rickinson, A.B. 1987. Human epithelial cell expression of an Epstein-Barr virus receptor. J. Gen. Virol. 68:805-811.

Sixbey, J., Shirley, P., Chesney, P., Buntin, D.M., Resnick, L. 1989. Detection of a second widespread strain of Epstein-Barr virus. Lancet ii:761-765.

Sixbey, J. W., Shirley, P., Sloas, M., Raab-Traub, N., Israele, W. 1991. A transformation incompetent nuclear antigen 2 deleted EBV associated with replicative infection. J. Infect. Dis. 163:1008-1015.

Smith, R.S., Rhodes, G., Vaughan, J.H., Horwitz, C.A., Geltosky, J.E., Whalley, A.S. 1986. A synthetic peptide for detecting antibodies to Epstein-Barr virus nuclear antigen in sera from patients with infectious mononucleosis. J. Infect. Dis. 154:885-889.

Sprunt, T.P., Evans, F.A. 1921. Mononuclear leukocytosis in reaction to acute infections (infectious mononucleosis). Johns Hopkins Hospital Bulletin 31:410-416.

Steeper, T.A., Horwitz, C.A., Ablashi, D.A., Salahuddin, S.Z., Saxinger, C., Saltzman, R., Schwartz, B. 1990. The spectrum of clinical and laboratory findings resulting from human herpesvirus-6 in patients with mononucleosis like illnesses not resulting from Epstein-Barr virus or cytomegalovirus. Am. J. Clin. Pathol. 93: 776-783.

Stinski, M.F. 1990. Cytomegalovirus and its replication. En: Fields, B.N., Knipe, D.M. (eds): Fundamental Virology. 2ª edición. Raven Press, Nueva York.

Sumaya, C.V., Ench, Y. 1985a. Epstein-Barr virus infectious mononucleosis in children. I. Clinical and general laboratory findings. Pediatrics 75:1003-1010.

Sumaya, C.V. Ench, Y. 1985b. Epstein-Barr infectious mononucleosis in children. II. Heterophil antibody and viral specific responses. Pediatrics 75:1011-1019.

Svedmyr, E., Ernberg, I., Seeley, J., Weiland, O., Masucci, G., Tsukuda, K., Szigeti, R., Masucci, M.G., Blomgren, H., Berthold, W., Henle, W., Klein, G. 1984. Virologic,

immunologic and clinical observations on a patient during the incubation, acute and convalescent phases of infectious mononucleosis. Clin. Immunol. Immunopathol. 30:437-450.

Tallqvist, H., Henle, W., Klemola E., Leskinen, E., Niemi, K., Malm, E., Tuuteri, L. 1973. Antibodies to Epstein-Barr-virus at the ages of 6 to 23 months in children with congenital heart disease. Scand. J. Infect. Dis. 5:159-161.

Tanner, J., Weis, J., Fearon, D., Whang, Y., Kieff, E. 1987. Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping and endocytosis. Cell 50:203-213.

The European Collaborative Study. 1991. Children born to women with HIV-1 infection: natural history and risk of transmission. Lancet 337:253-260.

The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 1992. The family Herpesviridae: an update. Arch. Virol. 123:425-449.

Thomas, H.I.J, Morgan-Capner, P. 1988. Rubella specific IgG subclass avidity ELISA and its role in the differentiation between primary rubella and rubella reinfection. Epidemiol. Infect. 101:591-598.

Thomas, H.I.J., Morgan-Capner, P. Enders, G., O'Shea, S.O. Caldicott, D., Best, J.M. 1992. Persistence of specific IgM and low avidity specific IgG, following primary rubella. J. Virol. Methods 39:149-155.

Thorley-Lawson, D. A., Israelsohn, E.S. 1987. Generation of specific cytotoxic T cells with a fragment of the Epstein-Barr virus encoded p63/latent membrane antigen. Proc. Natl Acad. Sci. USA 84:5384-5388.

Tilton, R.C., Dias, F., Ryan R.W. 1988. Comparative evaluation of three commercial tests for detection of heterophile antibody in patients with infectious mononucleosis. J. Clin. Microbiol. 26:275-278.

Tosato, G., Magrath, I., Koski, I., Dooley, N., Blaese, M. 1979. Activation of suppressor T cells during Epstein-Barr virus induced infectious mononucleosis. N. Engl. J. Med. 301:1133-1137.

Venables, P.J.W., Pawlowski, T., Mumford, P.A., Brown, C., Crawford, D.H., Maini, R.N. 1988. Reaction of antibodies to rheumatoid arthritis nuclear antigen with a synthetic peptide corresponding to part of Epstein-Barr nuclear antigen 1. Ann. Rheum. Dis. 47:270-279.

Vilmer, E., Lenoir, G.M., Virelizier, J.L., Griscelli, C. 1984. Epstein-Barr serology in immunodeficiencies: an attempt to correlate with immune abnormalities in Wiskott-

Aldrich and Chediak-Higashi syndromes and ataxia telangiectasia. Clin. Exp. Immunol. 55:249-256.

Vroman, B., Juka, J., Rodriguez, M., Pearson, G.R. 1985. Characterization of a major protein with a molecular weight of 160,000 associated with the viral capsid of Epstein-Barr virus. J. Virol. 53:107-113.

Werblin, T.P., Kim, Y.T., Quagliata, F., Siskind, G.W. 1973. Studies in the control of antibody synthesis. III. Changes in the heterogeneity of antibody affinity during the course of the immune response. Immunology 24:477-492.

Wielgaard, F., Scherders, J., Dagelinckx, C., Middeldorp, J.M. Sabbe, L.J.M., Belzen C.V. 1988. Development of an antibody capture IgM enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of acute Epstein-Barr virus infections. J. Virol. Methods 21:105-115.

Wollheim, F.A., Williams, R.C. Studies on the macroglobulins of human serum. I. 1966. Polyclonal immunoglobulin class M (IgM) increase in IM. N. Engl. J. Med. 274:61-67.

Woodward, C.G., Hambling, M.H. 1986. Testing for antibodies to Epstein-Barr virus nuclear antigen. Comm. Dis. Rep. 86/25:4.

Wutzler, P. 1991. Recombinant EBV antigens in the serodiagnosis of infectious mononucleosis. Biotest Bull. 4:325-328.

Yamanishi, K., Okuro, T., Shiraki, K., Takahashi, M., Asano, Y., Kurato, T. 1988. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. Lancet i:1065-1067.